台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.2 2020

Research Articles

113 Genetically Masked of Dorsocentral Bristle Expression by a Single Dominant Gene *DCm* in Melon Fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquilett)

Yun Cheng, Dong-Hong Wu, Zu-Hsien Wang, Yu-Bing Huang, Ming-Yao Chiang, Hsiu-Ying Lu, and Chung-Min Yang

122 Identification and Evaluation of Antagonistic Actinobacteria on Controlling Potato Common Scab

Ching-Yi Lin, Hui-Fang Ni, and Hui-Ju Lin

132 Identification and Pathogenicity of *Isaria javanica* CAES1 Isolated from the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) in Taiwan

Yu-Ping Liang and Tai-Chuan Wang

147 Parasitic Strategy and Circadian Rhythm of *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), a Natural Enemy of Mango Pest *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae)

Sheng-Feng Lin, Yi-Syuan Lee, Chia-Lin Liu, Man-Miao Yang, and Hsiou-Hua Hao

154 Polyploidization and Selection of Parents for Improving Breeding of Blue-Purple *Phalaenopsis*

Chin-Yi Tsao, Uei-Chern Chen, Rung-Yi Wu, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia

169 Morphological Diversity and Resistance to Powdery Mildew in Melon (*Cucumis melo* L.) Accessions

Ssu-Yu Lin, Jin-Hsing Huang, and Yu-Hwa Wang

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.2 2020

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.2 2020

研究報告

113 瓜實蠅 [*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)]「背中區剛毛」受單一顯性基因 *DCm* 抑制表現之研究

鄭允、吳東鴻、王志賢、黃毓斌、江明耀、呂秀英、楊宗民

122 具拮抗能力放線菌菌株之鑑定與防治馬鈴薯瘡痂病效果評估

林靜宜、倪蕙芳、林慧如

132 台灣地區咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 分離之 *Isaria javanica* CAES1 鑑定與致病性測試

梁鈺平、王泰權

147 檬果壯鋏普癭蚋之天敵 *Aprostocetus* sp.（膜翅目：釉小蜂科）寄生策略及日律活動

林聖豐、李奕萱、劉珈琳、楊曼妙、郝秀花

154 利用多倍體化及雜交親本篩選改進藍紫色蝴蝶蘭育種研究

曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鈮

169 甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 收集系外表型變異度之探討及白粉病抗感性之檢測

林思好、黃晉興、王毓華

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

林乃君／國立台灣大學農業化學系
謝廷芳／農業試驗所植物病理組

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十九卷　第二期　　中華民國一〇九年六月三十日

出版者	行政院農業委員會農業試驗所
發行人	林學詩
總編輯	楊純明
地址	41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址	http://www.tari.gov.tw
電話	(04)2331-7236
E-mail	jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統	http://www.ipress.tw/J0042
編印	Ainosco Press
地址	23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話	(02)2926-6006
E-mail	press@airiti.com
定價	新台幣一七五元
展售門市	1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207 國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw 2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(2):113–121 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202006_69(2).0001

Research Article

Genetically Masked of Dorsocentral Bristle Expression by a Single Dominant Gene *DCm* in Melon Fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquilett)

Yun Cheng[1], Dong-Hong Wu[2], Zu-Hsien Wang[3], Yu-Bing Huang[4,*], Ming-Yao Chiang[5], Hsiu-Ying Lu[6], and Chung-Min Yang[3]

Abstract

Cheng, Y., D. H. Wu, Z. H. Wang, Y. B. Huang, M. Y. Chiang, H. Y. Lu, and C. M. Yang. 2020. Genetically masked of dorsocentral bristle expression by a single dominant gene *DCm* in melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquilett). J. Taiwan Agric. Res. 69(2):113–121.

The melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquilett), does not possess the dorsocentral (DC) bristles. In a selected DC (+)-line, two rows of 4–6 median size macrochaetes appeared in the dorsocentral domain of scutum and it is interesting to explore its morphological identity and genetic origin. In morphology, these DC (+) bristles fit into the dorsocentral domains of Diptera chaetotaxy ground plan and those of model insect species, *Drosophila melanogaster* and *Ceratitis capitata*. In genetics, by crossing wild type to DC (+)-line, the majority of F_1 progeny were DC (–) phenotype or wild type. Segregation pattern of DC (+) and DC (–) phenotypes in the F_2 progeny fit a 1 : 3 inheritance pattern, with DC (–) phenotype being dominant. The backcross of F_1 to the DC (+)-line produced a 1 : 1 ratio in respect to DC (+) and DC (–) phenotypes, while F_1 backcross to wild type produced most DC (–) progeny, confirming that DC (+) bristle was suppressed by a single dominant gene. The gene was given the symbol *DCm* for *DorsoCentral bristles masked*. The DC (+) bristle was stereotype patterned instead of randomly expressed, hence the atavistic origin is preferred.

Key words: Dorsocentral bristles, Melon fly, Atavistic origin.

INTRODUCTION

The location and the arrangement of bristles, particularly on thorax, are defined characters (chaetotaxy) in the taxonomy of Diptera (McAlpine 1981; White & Elson-Harris 1992; Drew & Hancock 1994). There are many species of Diptera have different but equally stereotyped bristle patterns. The question arises as to how all of these different patterns are made from the basic genetic mechanisms (Simpson *et al*. 1999; Simpson & Marcellini 2006). A schematic representation of the ground plan of bristles (macrochaetes) on the scutum of Muscomorpha (McAlpine 1981)

Received: June 25, 2019; Accepted: February 12, 2020.
* Corresponding author, e-mail: ybhuang@tari.gov.tw
1 Former Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Technicians, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
4 Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
5 Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
6 Director, Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Miaoli County, Taiwan, ROC.

consisted of four rows of bristles: acrostichal (AC), dorsocentral (DC), intra-alar (IA) and supra-alar (SA). *Drosophila melanogaster* has been a model insect for the investigation into the genetic control of the arrangement of sensory bristles (Ghysen & Dambly-Chaudiere 1988).

The dorsocentral bristles are lacking in the melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquilett) (White & Elson-Harris 1992), and so are in most Dacinae (Drew & Hancock 1994). In the study of genetics of acrostichal prescutellar bristles (prsc) (Cheng *et al*. 2014), a multiple prsc (MB) strain which deprives the genetic modification of wild type and preserves only the quantitative genetic characters of prsc trait, was selected. In MB strain, some individuals developed two rows of median size stereotype patterned macrochaetes in the dorsocentral domain. The variant was isolated and designated as "DC (+)-line".

The macrochaetes patterns of Diptera were varied in the progress of evolution (Simpson & Marcellini 2006). By investigating the DC (+) variant, the inheritance information obtained may improve our knowledge in the development, the expression and the evolution of macrochaetes in Diptera (Simpson & Marcellini 2006), and the present study is going to focus on performance location and genetic analysis of DC (+) bristles.

MATERIALS AND METHODS

Insect materials

The parental materials used in this study constituted two melon fly strains. First, the wild strain, which has no dorsocentral bristles and was reared from the field collected specimens (Cheng *et al*. 2014). Second, the dorsocentral positive-strain [or DC (+)-line], the DC (+) phenotype, was isolated and cultured from the MB strain (Cheng *et al*. 2014).

Methods

Evaluation of DC (+) bristles. The expression of DC (+) bristles is scored into two classes in melon fly: the wild type does not exhibit DC (+) bristles and is designated as DC-free or DC (–) phenotype. The individual display DC (+) bristles is designated as DC-positive or DC (+) phenotype.

Performance location of DC (+) bristles and related chaetotaxy. The DC (+) bristles were positioned by their relative distance, from the notum midline (ML) to the intra-alar bristles, in a range of 100%. Two hypothetic chaetotaxy schemes and two model insects, which possess DC bristles, were chosen for the comparison.

(1) The ground plan of thorax macrochaetes of the Muscomorpha [Fig. 1A, adapted from Simpson *et al*. (1999) and McAlpine (1981)].
(2) The dorsal view of Dacinae thorax [Fig. 1B, from Drew & Hancock (1994)], showing the nomenclature and the location of bristles and a DC-free chaetotaxy model belonging to the taxonomic family of melon fly.
(3) *D. melanogaster* (Fig. 1C), an universal model insect in the chaetotaxy study (Simpson *et al*. 1999).
(4) *Ceratitis capitata* (Fig. 1D), a tephirite fly with DC bristles [from Wülbeck & Simposon (2000), Calleja *et al*. (2002), and Pistillo *et al*. (2002)].

Nota of wild type and MB-strain were presented in Fig. 2A–2B.

Genetic trials. Genetic trails were conducted between DC (+)-line and wild type. The target trait of inheritance analysis was evaluated in the F_1, F_2, and two backcross populations (BC_1 and BC_{1r}) derived from each parent involved three reciprocal crosses. The experiment was arranged in a randomized complete block design with 3–6 replications. Data were collected for goodness-of-fit to theoretical ratios using the Chi-square test (Kozik & Wehner 2008; da Cruz *et al*. 2010) for each of F_1, F_{1r}, F_1 (pooled), F_2, BC_1, and BC_{1r} families (Russell 2005; Griffiths *et al*. 2008).

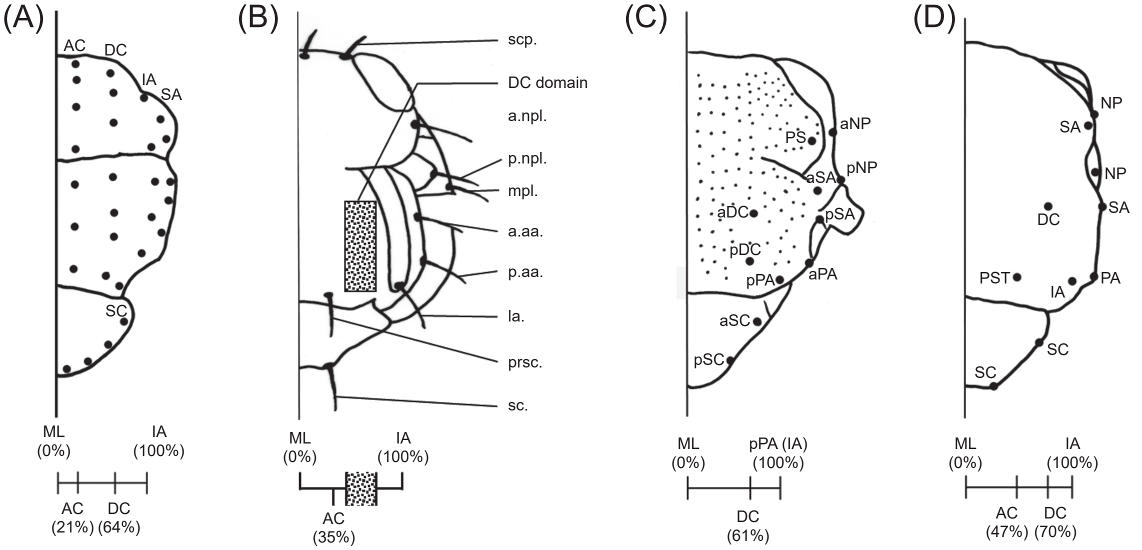

Fig. 1. The relative distances among bristle domains of chaetotaxy. (A) Diptern from McAlpine (1981) and Simpson *et al*. (1999); (B) Dacinae modified from Drew & Hancock (1994) to show the DC domain; (C) *Drosophila melanogaster* from Calleja *et al*. (2002); (D) *Ceratitis capitata* from Wülbeck & Simpson (2000). All bristle abbreviations corresponded to their original reports.

Statistical analysis

All data analysis was performed in the R 3.3.3 (R Development Core Team 2008) environment. Except F_1 and BC_1 families with recurrent parent "wild type", the families of F_2 and BC_1 population derived from recurrent parent "DC (+) type" were evaluated by counting the number of expression and non-expression of DC (+) bristles. The data was subjected to the Chi-square test to verify adjustment to the theoretical proportions expected the inheritance patterns for one gene, two duplicate genes and two complementary genes. The Chi-square values were obtained through the following formula:

$$\chi^2 = \sum (F_o - F_e)^2 / F_e$$

Where F_o = observed frequency for each class; and F_e = expected frequency for each class, based on the Mendelian proportion.

RESULTS

The chaetotaxy comparison of DC (+)-line to two hypothetic schemes and two model insects were presented in Table 1 and Figs. 1–2. The AC bristles are located closer to the thorax midline than the DC bristles. The prsc usually is the only postsutural AC bristle in Acalypterata (Simpson *et al.* 1999), in a 100% range from ML to IA, the AC domain is 21–47% from the ML, while the DC domain is 60–70% from the ML. Two rows of 4 DC (+) bristles located at 65% from ML to IA, and fit into the DC domain (Fig. 2C–2D).

In genetic study, F_1 hybrids of 6 families were developed by the three reciprocal crosses between DC (+)-line and wild type. The segregation patterns of each family were presented in Table 2, the progenies with DC (+) bristles were very few (37 flies) in 541 pooled F_1 flies and the segregation patterns were similar in the three reciprocal crosses. The results suggested that the sex-linkage effect was not involved in the inheritance of DC (+) bristles. The segregation pattern of each F_1 family was close to the ratio of 1.0 for DC (+) phenotype and the other type. The six full-sib families of F_2 progenies were developed from the three re-

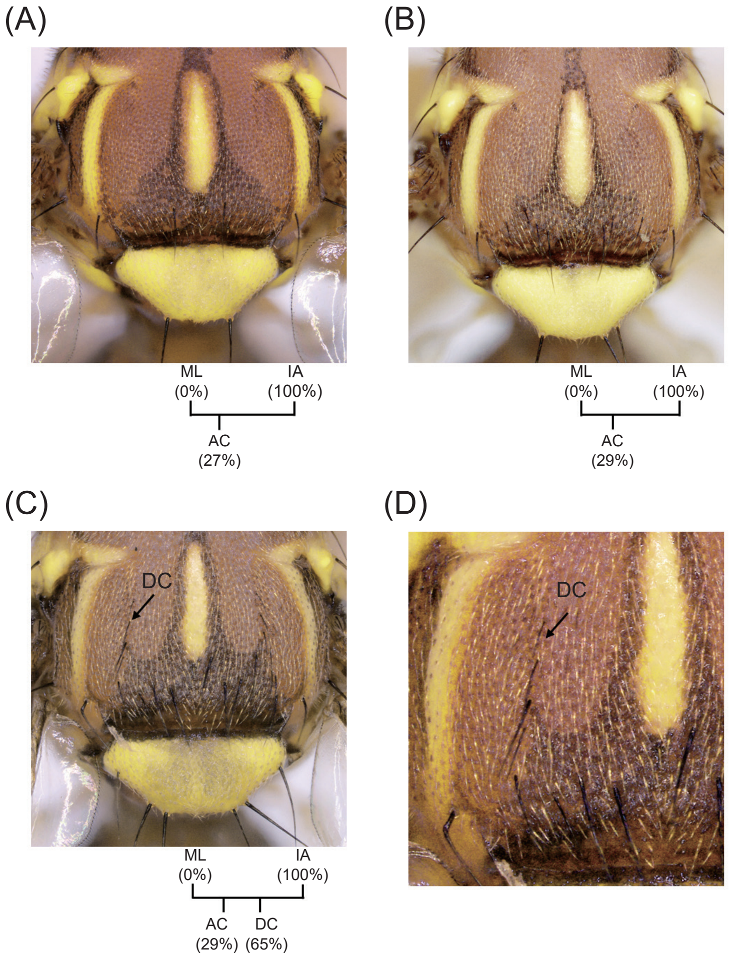

Fig. 2. The relative distances among bristle domains of (A) wild type; (B) MB strain; and (C) DC (+)-line of *Zeugodacus cucurbitae*. (D) Enlarged view of plate C to show DC bristles.

Table 1. Relative distance of acrostichal (AC) and dorsocentral (DC) from midline (ML) of scutum to intra-alar (IA) in the chaetotaxy of models and fruit fly species.

Model or fruit fly	Relative distance from ML (100% to IA)		Fig.
	AC	DC	
Ground plan of Diptern[z]	21	64	1A
Ground plan of Dacinae[y]	35	-	1B
Drosophila melanogaster[x]	-	61	1C
Ceratitis capitata[w]	47	70	1D
Zeugodacus cucurbitae	27	-	2A
Z. cucurbitae, the MB strain	29	-	2B
Z. cucurbitae, the DC (+)-line	28	65	2C

[z] Adapted from McAlpine (1981) and Simpson *et al*. (1999).
[y] Adapted from Drew & Hancock (1994).
[x] Adapted from Calleja *et al*. (2002).
[w] Adapted from Wülbeck & Simpson (2000).

Table 2. Number of DC (+) phenotype, DC (–) phenotype, total progeny and adjustment of Chi-square test for 6 F_1 families of melon flies evaluated for dorsocentral bristle expression.

Family	Cross[z]	DC (–)	DC (+)	Total	Chi-square test 1 : 0
F_1N_1	W × D	87	13	100	-
F_1N_2	W × D	97	2	99	-
F_1N_3	W × D	60	2	62	-
F_1R_1	D × W	82	18	100	-
F_1R_2	D × W	82	2	84	-
F_1R_3	D × W	96	0	96	-
Pooled		504	37	541	-

[z] D and W indicate DC (+) phenotype and wild type [DC (–) phenotype], respectively.

ciprocal crosses between DC (+)-line and wild type strain. The fly number of DC (+) progenies was up to 651 in the pooled F_2 population (2,835 flies) and the ratio of DC (+) was closed to 23% (Table 3). In advance, the segregation ratio of each F_2 family was determined in Chi-square goodness-of-fit tests for the pattern of one gene (3 : 1), two duplicate genes (15 : 1) or two complementary genes (9 : 7). The results showed that the inheritance pattern of DC (+) bristles was very significantly different with two gene model. The segregation ratios of four mating population were good to fit the one dominant gene pattern and DC (+) phenotype was the recessive trait compared with wild type.

In backcross families, there were two backcross populations developed with two recurrent parents (RP), respectively. In the backcross population derived from the RP “wild type”, the segregation pattern of three reciprocal crosses was close the ratio of 1 : 0 for DC (–) and DC (+) phenotype (Table 4). The DC (+) type were only ten flies in the 541 pooled backcross progenies. In the other backcross population, the DC (+) type strain was used as the recurrent parent. The inheritance pattern of six BC_{1r} backcross families (pooled 560 flies) was determined to fit the ratio of 1 : 1 for DC (–) and DC (+) phenotypes (Table 5), suggesting that the one dominant gene controls the expression of DC (+) bristles and DC (+) phenotype belongs to the recessive trait compared with wild fly.

Table 3. Number of DC (+) phenotype, DC (–) phenotype, total progeny and adjustment of Chi-square test for 6 F_2 families of melon flies evaluated for dorsocentral bristle expression.

Family	Cross[z]	DC (–)	DC (+)	Total	Chi-square test[y] 3 : 1	15 : 1	9 : 7
F_2N_1	W × D	532	150	682	3.29	288.52***	131.17***
F_2N_2	W × D	322	96	418	0.92	199.35***	73.37***
F_2N_3	W × D	351	104	455	1.11	214.17***	80.70***
F_2R_1	D × W	158	86	244	13.66***	350.12***	7.17**
F_2R_2	D × W	390	83	473	14.01***	103.03***	131.96***
F_2R_3	D × W	431	132	563	0.73	284.12***	94.31***
Pooled		2,184	651	2,835	6.27*	1,351.50***	497.78***

[z] D and W indicate DC (+) phenotype and wild type [DC (–) phenotype], respectively.
[y] $\chi^2_{.05(1)} = 3.84$, $\chi^2_{.01(1)} = 6.63$, $\chi^2_{.001(1)} = 10.83$.
*, **, ***Significant at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

Table 4. Number of DC (+) phenotype, DC (–) phenotype, total progeny and adjustment of Chi-square test for 6 BC_1 families with recurrent parent "wild type" of melon fly evaluated for dorsocentral bristle expression.

Family	Cross[z]	DC (–)	DC (+)	Total	Chi-square test 1 : 0
BC_1N_1	$F_1 \times W$	41	0	41	-
BC_1N_2	$F_1 \times W$	73	1	74	-
BC_1N_3	$F_1 \times W$	27	5	32	-
BC_1R_1	$W \times F_1$	157	1	158	-
BC_1R_2	$W \times F_1$	107	2	109	-
BC_1R_3	$W \times F_1$	126	1	127	-
Pooled		531	10	541	-

[z] W stands for wild type or the DC (–) phenotype.

Table 5. Number of DC (+) phenotype, DC (–) phenotype, total progeny and adjustment of Chi-square test for 6 BC_{1r} families with recurrent parent "DC (+) type" of melon fly evaluated for dorsocentral bristle expression.

Family	Cross[z]	DC (–)	DC (+)	Total	Chi-square test[y] 1 : 1
$BC_{1r}N_1$	$F_1 \times D$	26	14	40	3.600
$BC_{1r}N_2$	$F_1 \times D$	44	29	73	3.080
$BC_{1r}N_3$	$F_1 \times D$	16	11	27	0.930
$BC_{1r}R_1$	$D \times F_1$	95	96	191	0.005*
$BC_{1r}R_2$	$D \times F_1$	65	59	124	0.290
$BC_{1r}R_3$	$D \times F_1$	50	55	105	0.230
Pooled		296	264	560	1.830

[Z] D stands for DC (+) phenotype.
[y] $\chi^2_{.05(1)} = 3.84$.
*Significant at 5% level.

The symbol *DCm* for *DorsoCentral bristle masked* is proposed to designate this single completely dominant gene.

DISCUSSION

In morphology, DC (+) bristles is located in the dorsocentral domain of the scutum. The monohybrid cross confirmed that wild type melon fly hosted *DCm*. The genetic analysis fits the Mendel's general conclusions (Russell 2005) as followings: (1) The results of reciprocal crosses were always the same. (2) All F_1 progeny resembled one of the parental strains. (3) In F_2 generation, the parental trait that had disappeared in F_1 generation reappeared at 1 : 3 ratios. The results of two backcrosses confirmed the single dominant gene action in wild type can prevent the expression of DC (+) bristles in melon fly.

The melon fly did not have the dorsocentral bristles, and so there is an issue about the identity of newly emerged DC (+) bristles. The observation is that DC (+)-line only emerged in the MB strain naturally and frequently. One thing we know so far about the MB strain is that it deprives the genetic input of wild type; hence, conserves the quantitative genetic nature in prsc trait. The results showed that the *DCm* exists in wild type, but not in the MB strain. The DC (+) bristles are expressed in the MB strain only. Similarly, it has been concluded in the prsc study that the MB strain is wild type free (Cheng *et al*. 2018).

How about the origin of DC (+) bristles? It has been mentioned in genetics that, if a trait

acted as a recessive allele and can be hidden in the population as heterozygotes, once the suppression factor was lifted, the recessive allele has the chance to form homozygotes in population and the trait reappeared (Hartl 1999). Deja Vu, the DC (+) bristles may serve as a perfect example. The wild type, the MB strain, the DC (+)-line, the DC (+) phenotype and the *DCm* are all parts of the story. Therefore, DC trait reappeared in the atavistic pattern at the original DC domain (Simpson *et al*. 1999). The probability of DC (+) phenotype to be a mutant is also possible, but the probability is low. Instead of randomly expressed, DC (+) bristles emerged stereotype pattern in a fixed domain and can be considered as highly organized complex in developmental biology (Carroll 2005).

Although DC (+) bristle emerged in the MB strain, but it has not related to the prsc bristle because the dorsocentral and acrostichal clusters have different developmental origins (Wülbeck & Simpson 2000).

It has been speculated that DC bristles were long lost in most species of Dacinae in evolution, while the *DCm* and DC (+) bristles proved that it is not the case in melon fly. Whether the *DCm* is a common gene shared in other DC-free Dacinae species need to be further studied.

CONCLUSION

By comparing the chaetotaxy of *D. melanogaster*, *C. capitata* and Diptern model, two rows of 4–6 medium sized macrochaetes in the dorsocentral domain of DC (+) phenotype are identified to be DC bristles. The genetic study confirmed that DC bristles are a recessive character, coming out from the suppression of a single dominant gene *DCm*. The emerged DC (+) bristles were stereotype patterned at fixed location of dorsocentral domain, implying that DC (+) bristles are highly organized and specialized. Thus, the atavistic origin is possible. In other words, the dorsocentral bristle of melon fly may not be lost in evolution, rather simply being masked by a dominant gene, *DCm*.

REFERENCES

Calleja, M., O. Renaud, K. Usui, D. Pistillo, G. Morata, and P. Simpson. 2002. How to pattern an epithelium: Lessons from *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila*. Gene 292:1–12. doi:10.1016/S0378-1119(02)00628-5

Carroll, S. B. 2005. Endless Forms Most Beautiful: The New Science of Evo Devo. Norton & Company. New York, NY. 350 pp.

Cheng, E. Y., C. H. Wang, Y. B. Huang, and M. Y. Chiang. 2014. The quantitative genetics of prescutellar bristles in melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). J. Taiwan Agric. Res. 63:179–187. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2014.06303.01

Cheng, E. Y., Z. H. Wang, Y. B. Huang, M. Y. Chiang, H. Y. Lu, D. H. Wu, C. M. Yang, and C. C. Nien. 2018. Reduction in genetic variability for quantitative trait prescutellar bristle number of melon fly [*Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)]. J. Taiwan Agric. Res. 67:337–346. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201812_67(4).0002

da Cruz, R. P., I. T. de Lima Duarte, and C. Cabreira. 2010. Inheritance of rice cold tolerance at the seedling stage. Sci. Agric. 67:669–674. doi:10.1590/S0103-90162010000600008

Drew, R. A. I. and D. L. Hancock. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. Bull. Entomol. Res. 2:1–68. doi:10.1017/S1367426900000278

Ghysen, A. and C. Dambly-Chaudiere. 1988. From DNA to form: The *achaete-scute* complex. Genes Dev. 2:495–501. doi:10.1101/gad.2.5.495

Griffiths, A. J. F., S. R. Wessler, R. C. Lewontin, and S. B. Carroll. 2008. Introduction to Genetic Analysis. 9th ed. W. H. Freeman and Company. New York, NY. 868 pp.

Hartl, D. L. 1999. A Primer of Population Genetics. 3rd ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 221 pp.

Kozik, E. U. and T. C. Wehner. 2008. A single dominant gene *Ch* for chilling resistance in cucumber seedlings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133:225–227. doi:10.21273/JASHS.133.2.225

McAlpine, J. F. 1981. Manual of Nearctic Diptera. Research Branch, Agriculture Canada. Ottawa, Canada. 680 pp.

Pistillo, D., N. Skaer, and P. Simpson. 2002. *scute* expression in *Calliphora vicina* reveals an ancestral pattern of longitudinal stripes on the thorax of higher Diptera. Development 129:563–572.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org (visit on 10/02/2015)

Russell, P. J. 2005. iGenetics: A Mendelian Approach. Benjamin Cummings. San Francisco, CA. 850 pp.

Simpson, P., R. Woehl, and K. Usui. 1999. The development and evolution of bristle patterns in Diptera. Development 126:1349–1364.

Simpson, P. and S. Marcellini. 2006. The origin and evolution of stereotyped patterns of macrochaetes on the nota of cyclorraphous Diptera. Heredity 97:148–156. doi:10.1038/sj.hdy.6800874

White, I. M. and M. M. Elson-Harris. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. CAB International. Wallingford, UK. 601 pp.

Wülbeck, C. and P. Simpson. 2000. Expression of *achaete-scute* homologues in discrete proneural clusters on the developing notum of the medfly *Ceratitis capitata*, suggests a common origin for the stereotyped bristle patterns of higher Diptera. Development 127:1411–1420.

瓜實蠅 [*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)]「背中區剛毛」受單一顯性基因 *DCm* 抑制表現之研究

鄭允[1] 吳東鴻[2] 王志賢[3] 黃毓斌[4,*] 江明耀[5] 呂秀英[6] 楊崇民[3]

摘要

鄭允、吳東鴻、王志賢、黃毓斌、江明耀、呂秀英、楊崇民。2020。瓜實蠅 [*Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)]「背中區剛毛」受單一顯性基因 *DCm* 抑制表現之研究。台灣農業研究 69(2):113–121。

雙翅目「中胸背板」上剛毛之數量分布及排列模式是分類的重要依據，其中「背中區剛毛」在瓜實蠅所屬的 Dacinae 亞科中已因演化而消失。行政院農業委員會農業試驗所飼育之瓜實蠅中，有一「中胸背板多剛毛」品系中頻頻出現具兩列整齊排列「背中區剛毛」的個體。此等個體上「背中區剛毛」之來源及發生原因，具有剛毛發生及遺傳上之研究價值。本研究特將具此特徵之瓜實蠅另行育成 DC (+)-line 品系，以供研究之用。出現於 DC (+)-line 之「背中區剛毛」為縱向整齊排列 4–6 隻中型大小之剛毛，分列中胸背板兩側之「背中區」，經測定位於自背板中線 (midline) 起，至「翅內剛毛」(intra-alar) 止之 60–70% 處；也落於「雙翅目中胸背板剛毛模式圖」 (groand plan of chaetotoxy; McAlpine 1981) 背中區內，此與兩種具「背中區剛毛」模式 (model) 蠅種 *Drosophila melanogaster* 及 *Ceratitis capitata* 之位置相當。以「野生型」與「背中型」進行遺傳試驗時，用處女 (雄) 蠅配對，兩品系雌雄交互配對各 3 對，並觀察子代之表現型及數量。發現 F_1 子代中「背中型」出現的機率趨近於零 (37/541)，而 F_2 子代中「背中型」出現且可達 23% (651/2,835)，6 組配對中有 4 組合乎 3 : 1 之單一顯性因子理論推論，並與雙因子 (15 : 1) 及雙互補因子 (9 : 7) 遺傳之推論全數不符合，且無性聯遺傳現象 (sex-linkage)。而在回交的測試，與「野生型」之回交中產生的「背中型」在全數 531 隻子代中僅有 10 隻，而趨近於零。與「背中型」回交之子代 560 隻中產生近半數之「背中型」，數值為 264 隻，經 Chi-square 分析，驗證與 1 : 1 之理論推值相符。本研究結論為瓜實蠅之「背中剛毛」之表現與否，係由單一顯性基因控制，存在於「野生型」中，由其抑制「背中剛毛」之表現，而「背中剛毛」表現屬隱性特徵，因此將此一基因定名為 *DCm* (*DorsoCentral bristle masked*)。由於「背中剛毛」之出現是在無「野生型」介入之「多剛毛」品系中，且完整地以兩列整齊方式出現，而非以逢機或突發性方式出現，因此推論為「返祖」現象而非突變。因隱性基因可長期以 heterozygotes 方式隱藏於族群中，當顯性抑制基因消退時，逐漸形成 homozygotes 而重現。此外，是否 *DCm* 為現今雙翅目中抑制「背中區剛毛」之共同因子，亦為未來值得探討的方向。

關鍵詞：背中區剛毛、瓜實蠅、返祖。

投稿日期：2019 年 6 月 25 日；接受日期：2020 年 2 月 12 日。
* 通訊作者：ybhuang@tari.gov.tw
[1] 農業委員會農業試驗所應用動物組退休研究員。台灣 台中市。
[2] 農業委員會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農業委員會農業試驗所應用動物組技工及技術工。台灣 台中市。
[4] 農業委員會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
[5] 農業委員會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市
[6] 農業委員會苗栗區改良場場長。台灣 苗栗縣。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(2):122–131 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202006_69(2).0002

研究報告

具拮抗能力放線菌菌株之鑑定與防治馬鈴薯瘡痂病效果評估

林靜宜[1,*] 倪蕙芳[2] 林慧如[3]

摘要

林靜宜、倪蕙芳、林慧如。2020。具拮抗能力放線菌菌株之鑑定與防治馬鈴薯瘡痂病效果評估。台灣農業研究 69(2):122–131。

馬鈴薯瘡痂病為嚴重影響馬鈴薯產量與品質之重要病害之一，目前並無有效之防治藥劑可用，而輪作及抗病品種等耕作防治法效果亦有限。因此，本研究自高雄不同地區之土壤分離純化 85 株放線菌後，以玻璃紙抗生法於培養基上初步篩選對馬鈴薯瘡痂病菌 *Streptomyces europaeiscabiei* 具有拮抗活性之菌株，再利用拮抗菌株之培養濾液進一步測試其拮抗活性。結果發現，菌株 35-2 與 43-21 對 *S. europaeiscabiei* 病原之拮抗能力最佳。進一步利用 16S rRNA 基因序列分析後初步鑑定 35-2 與 43-21 菌株為鏈黴菌 *Streptomyces rochei* 與 *Streptomyces neopeptinius*。溫室試驗結果亦顯示，以菌株 35-2 與 43-21 之培養濾液澆灌馬鈴薯植株後，薯塊之罹病度分別為 28.0% 及 35.0%，明顯低於對照組之罹病度 61.5%。由此顯示，此兩拮抗菌株具有降低薯塊發生馬鈴薯瘡痂病罹病度之潛力，同時此兩株拮抗菌具有促進馬鈴薯薯塊生長的效果。

關鍵詞：馬鈴薯瘡痂病、鏈黴菌、生物防治。

前言

馬鈴薯瘡痂病 (common scab) 為馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 重要之細菌性土傳性病害，廣泛存在於世界各地之馬鈴薯產區。本病的病原菌為放線菌中具有致病性的鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.)，已知主要的病原菌種類包含：*Streptomyces scabies* (Lambert & Loria 1989b)、*Streptomyces acidiscabies* (Lambert & Loria 1989a)、*Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima *et al*. 1998) 及 *Streptomyces europaeiscabiei* (Bouchek-Mechiche *et al*. 2000)，其他鏈黴菌屬之 *Streptomyces bottropensis*、*Streptomyces stelliscabiei* 及 *Streptomyces aureofaciens* 等亦有報導指出可造成馬鈴薯瘡痂病的發生 (Leiminger *et al*. 2013)。這些病原菌危害馬鈴薯後所產生的病徵，主要為薯塊表面出現木栓化、瘡痂狀或疣狀的褐色病斑，嚴重時病斑相互癒合並呈網狀龜裂，導致馬鈴薯外觀及品質降低且不耐儲藏，嚴重影響馬鈴薯鮮食及加工的市場銷售價，造成重大的經濟損失。

馬鈴薯瘡痂病之病原菌除了可存活於罹病薯塊殘體，亦可藉腐生方式生存於土壤中，導致此病害之防治與管理至今仍是個棘手的問題。傳統的防治方法如輪作、管理土壤水分、利用土壤改良劑調整土壤 pH、土壤燻蒸消毒或是於種植前利用藥劑處理種薯等方式，其防治成效通常不穩定，甚至有些方法對於作物生長與生態環境多有損害 (Larkin *et al*. 2011; Dees & Wanner 2012)。抗病品種為對抗病害的有效方式之一，雖然馬鈴薯品種繁多，且已篩選出對馬鈴薯瘡痂病具有不同程度抗性之品種，然而截至目前為止並未發現具有完全抗性 (免疫) 之品種 (Goth *et al*. 1993; Dees & Wanner 2012)。近年來，生物防治法蓬勃

投稿日期：2019 年 9 月 5 日；接受日期：2019 年 12 月 17 日。
[*] 通訊作者：eris2024@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系計畫助理。台灣 嘉義市。

發展，已有不少鏈黴菌應用於植物病害防治的成功案例，亦有些成功開發成商品化之植物保護製劑，如 Actinovate® (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) 及 Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* K61) 等。台灣目前也有登記用於疫病等病害防治的純白鏈黴菌 (*Streptomyces candidus* Y21007) 商品化產品如安心寶 ® 等。這些例子也提供了馬鈴薯瘡痂病防治策略另一種具有發展潛力的新興防治途徑。

利用拮抗菌防治馬鈴薯瘡痂病的相關研究方面，目前已發現除了以無病原性鏈黴菌 (non-pathogenic *Streptomyces* spp.) (Hiltunen *et al*. 2009; Wanner *et al*. 2014; Sarwar *et al*. 2018; Sarwar *et al*. 2019) 作為拮抗菌具有抑制馬鈴薯瘡痂病菌生長的能力，可提供生物防治的效果之外，利用假單胞菌 (*Pseudomonas* spp.) (Arseneault *et al*. 2015) 與芽孢桿菌 (*Bacillus* spp.) (Meng *et al*. 2013; Lin *et al*. 2018a) 作為生物防治菌，亦對馬鈴薯瘡痂病菌具有拮抗效果。而就馬鈴薯瘡痂病菌而言，雖以 *S. scabies* 最廣為熟知，但近年來已陸續發現多種具有病原性之鏈黴菌亦可引起馬鈴薯瘡痂病，如 *S. turgidiscabies* 及 *S. europaeiscabiei* 等，且研究指出多種馬鈴薯瘡痂病菌可於田間發生複合感染 (Wanner 2009)。其中，*S. europaeiscabiei* 與 *S. scabies* 於 16S 核糖體 RNA (16S ribosomal RNA; 16S rRNA) 雖具有高序列相似度，但分類上卻為不同種 (Flores-González *et al*. 2008)。目前對於 *S. europaeiscabiei* 之特性、與寄主和其他瘡痂病菌之交互作用等方面資訊所知有限，且其分布有愈來愈廣泛的趨勢。

目前除了是造成歐洲地區之馬鈴薯瘡痂病的主要病原菌之外 (Flores-González *et al*. 2008; Leiminger *et al*. 2013)，近年來亦於美國、加拿大及南韓等地發現其蹤跡 (Song *et al*. 2004; Wanner 2009; Hiltunen *et al*. 2014)，台灣則於 2015 年首次發現 (Lin *et al*. 2018b) 此病原菌之危害。因此，本研究將以 *S. europaeiscabiei* 作為研究標的，由林相土壤中篩選對其具有拮抗效果之放線菌，並於溫室中評估其防治馬鈴薯瘡痂病之效果。

材料與方法

土壤放線菌菌株之採集、分離及保存

採集高雄市甲仙、美濃、田寮及燕巢地區等不同林區根圈土壤，每份土樣之採集地點皆以 GPS 衛星定位。收集之土樣經風乾後利用孔徑 20 目 (mesh) 篩網過篩，保存於室溫下。利用土壤系列稀釋平板法分離放線菌，每一土樣秤取 10 g 加入 100 mL 無菌水攪拌 30 s，靜置後取上清液以無菌水進行 10× 系列稀釋後，分別取 10^{-4} 及 10^{-5}× 之土壤稀釋液 100 μL。以 L 型玻棒均勻塗布於添加 0.02% 尿酸 (urea) 及 50 μg mL^{-1} nystatin 之 1.5% water agar (WA) 培養基平板上，於室溫下培養 2 wk 以上。初步以培養基上菌落型態為依據，挑取疑似放線菌之菌落至添加 50 μg mL^{-1} nystatin 的 International Streptomyces Project medium 4 培養基 (ISP-4, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 平板上純化。再以單一菌落純化 3 次後，待菌株產孢後，刮取孢子至盛裝滅菌土之保存管中供日後試驗使用 (Huang 2008)。

供試馬鈴薯瘡痂病菌與放線菌接種源之製備

本研究使用之瘡痂病菌菌株為 *S. europaeiscabiei* St1563，為本實驗室自嘉義地區罹病馬鈴薯塊上分離並以滅菌土保存其孢子 (Lin *et al*. 2018b)。將保存的瘡痂病菌畫線於 ISP-4 培養基上活化後，再以 ISP-4 培養基更新培養。於 30℃恆溫培養箱中培養 7 d 後，刮取孢子以無菌水製成懸浮液，懸浮液利用光電比色計於 600 nm 波長下測定，調整其吸光值 (optical density; OD) 為 0.3，菌量濃度約為 10^8 CFU mL^{-1} (colony-forming unit; CFU) 即可作為試驗中之接種源。

放線菌與馬鈴薯瘡痂病菌之抗生測定

本試驗利用玻璃紙抗生法，進行放線菌對馬鈴薯瘡痂病菌之拮抗能力初步篩選。將純化保存之放線菌菌株，分別畫線於 ISP-4 培養基上活化後，再以 ISP-4 培養基更新培養。於 30℃恆溫培養箱中培養 5 d 後所得之菌落，

以直徑 3 mm 打孔器切取菌塊，移至已貼有滅菌之 3.5 cm × 3.5 cm 玻璃紙的 ISP-4 培養基直徑 5.5 cm 中心點位置。於 30℃恆溫培養箱中培養 72 h 後，將玻璃紙連同放線菌菌塊一起撕下。再將培養於 ISP-4 培養基 7 d 後之 *S. europaeiscabiei* St1563 菌株，刮取孢子以無菌水製成懸浮液，取 100 µL 以 L 型玻棒均勻塗布於前述 ISP-4 培養基。每處理 3 重複，置於 30℃恆溫培養箱中，培養 7 d 後，取出測量抑制圈大小。

不同培養時間對放線菌培養液拮抗 *S. europaeiscabiei* St1563 能力之影響

利用放線菌小量培養之培養濾液，進行對 *S. europaeiscabiei* St1563 拮抗能力測定。以無菌水配製拮抗放線菌之孢子懸浮液，將濃度調整約為 10^8 CFU mL^{-1}。取 1 mL 之細菌懸浮液，加入裝有 100 mL 之營養液體培養基 (Luria Bertani, LB broth, Miller) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 的三角燒瓶中，置於 30℃之恆溫震盪培養箱中培養，培養時間分為 0、7、14 及 21 d。培養之菌液以雙層紗布濾除菌體後，再利用 0.22 µm 濾膜過濾。所得之培養濾液取 200 µL 加入 9.0 cm ISP-4，培養基中心點位置已放置不鏽鋼培養環 (內圈直徑 6 mm) 之中，再以滅菌棉花棒將 *S. europaeiscabiei* St1563 之孢子懸浮液均勻塗布於前述 ISP-4 培養基。每處理 3 重複，置於 30℃恆溫培養箱中，培養 7 d 後，取出測量抑制圈大小。

16S rRNA 基因序列分析

參考 Wang *et al*. (1993) 之方法並略加修改後進行核酸萃取，將拮抗菌株 35-2 及 43-21 於 ISP-4 培養基平板上培養 7 d 後，刮取菌落放入 50 µL 之 0.5 N NaOH，劇烈震盪後短暫離心，再加入 150 µL 之 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 混合均勻。取 10 µL 加入無菌水稀釋 10×，再以此製備液 1 µL 作為模板。利用 16S rRNA 序列設計的廣效性引子對 UniF (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’)/UniR (5’-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3’) (Edwards *et al*. 1989) 進行聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR)。反應以 PCR 試劑套組 (Fast-Run™ 2× Taq Master Mix, Protech, Taipei, Taiwan) 進行，反應總體積為 20 µL。反應條件如下：94℃變性 1 min；94℃變性 30 s，57℃黏合 30 s，72℃延伸 90 s，共 35 個循環；最後經 72℃延伸 1 min 完成反應。反應完成後之產物，以於 1.5% 瓊脂凝膠進行電泳分析，再經電泳圖譜結果得知反應於 1,514 bp 處增幅出一特定條帶，經解序 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 後，上傳 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫進行比對。

具拮抗能力鏈黴菌防治馬鈴薯瘡痂病菌之效果

本研究以馬鈴薯栽培品種克尼伯 (*Solanum tuberosum* L. var. ‘Kennebec’) 作為供試植物，將已萌芽之馬鈴薯種薯切塊，每小塊至少留有 1 芽眼。切塊後置陰涼處 1 d，再種植於裝有泥炭土栽培介質之 4 吋軟盆中，生長 2 wk 後作為試驗接種植株。將具拮抗能力之菌株 35-2 及 43-21 以 LB broth 小量培養 7 d 後之培養液，經雙層紗布濾除菌體後再利用 0.22 µm 濾膜過濾。所得之培養濾液以無菌水 10× 稀釋後，利用土壤澆灌法施用於馬鈴薯植株根圈土壤。每株植物澆灌 150 mL，每 7 d 施用 1 次，連續 6 次。以未含拮抗放線菌 LB broth 濾液處理之植株作為對照組。第 1 次施用後 7 d，進行馬鈴薯瘡痂病菌接種。接種時將 50 mL 之馬鈴薯瘡痂病菌孢子懸浮液 (10^8 CFU mL^{-1}) 直接灌注根圈土壤中，每組分別接種處理 10 株馬鈴薯。本防治試驗進行 2 次。接種後的植株於溫室中生長達 8 wk 後，收取其地下部薯塊，依罹病指數 (disease index) 觀察其罹病等級及發病情形，並計算罹病度 (disease severity)。瘡痂病罹病等級分為 5 級：0 級 - 無病徵、1 級 -1–10% 薯塊表面積出現木栓化、瘡痂狀或疣狀的褐色病斑、2 級 -11–40% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑、3 級 -41–60% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑、4 級 -61–90% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑、5 級 - > 90% 薯塊表面積出現瘡痂病病斑 (Leiminger *et al*. 2013)，再依照下列公式計算其罹病度。

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{\Sigma ni \times i}{N \times 5} \times 100\% \qquad (1)$$

i：發病等級
ni：發病 i 級的薯塊數
N：調查的總薯塊數

具拮抗能力鏈黴菌之培養濾液對馬鈴薯生長的影響

分別將拮抗菌株 35-2 及 43-21 之培養濾液利用土壤澆灌法處理種植 1 wk 後之馬鈴薯植株，每次澆灌 150 mL，每 7 d 施用 1 次，連續 4 次，對照組則以 150 mL LB broth 澆灌植株。每組依前述方法分別接種處理 10 株馬鈴薯，處理後的植株於溫室中生長 5 wk 後測量植株之株高、鮮重及薯塊等之生長情形。

統計分析

試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (Fisher's least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

放線菌與馬鈴薯瘡痂病菌之抗生效果

本研究自高雄市甲仙、美濃、田寮、燕巢、杉林及那瑪夏地區之土壤分離篩選出 85 株放線菌，利用玻璃紙抗生法初步篩選對 *S. europaeiscabiei* St1563 具有拮抗能力之菌株。結果顯示，其中 18 株菌株具有抑制 *S. europaeiscabiei* St1563 生長的效果，分別分離自甲仙、美濃、田寮、燕巢及杉林，惟那瑪夏地區未篩選出具有拮抗能力之菌株 (表 1)。進一步將菌株抑制效果區分為抑制圈小於 1 cm (antagonistic activity index = 1)、抑制圈介於 1–2 cm 之間 (antagonistic activity index = 2)、抑制圈介於 2–3 cm 之間 (antagonistic activity index = 3) 和抑制圈大於 3 cm (antagonistic activity index = 4) 等 4 種，結果發現抑制圈大於 3 cm 者共有 2 株，分別篩選自杉林及田寮地區 (表 1)。本試驗依抑制圈大小選擇抑制效果最佳之菌株 35-2 與 43-21 進行後續試驗。

表 1. 不同地區採集之土壤放線菌抑制瘡痂病菌之效果。

Table 1. Effect of actinobacteria isolated from different locations with antagonistic activities against *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 on ISP-4 medium.

Collected location	Number of isolates	Number of collected isolates with antagonistic activity against St1563				
		0[z]	1	2	3	4
Jiaxian	10	6	0	3	1	0
Meinong	39	32	0	3	4	0
Tianliao	16	14	0	1	0	1
Yanchao	7	5	0	2	0	0
Shanlin	4	1	2	0	0	1
Namaxia	9	9	0	0	0	0

[z] The antagonistic activity index was rated by the diameter of the inhibition zone: 0: no inhibition; 1: the diameter of inhibition zone < 1 cm; 2: 1 cm ≤ the diameter of inhibition zone < 2 cm; 3: 2 cm ≤ the diameter of inhibition zone < 3 cm; 4: the diameter of inhibition zone ≥ 3 cm.

不同培養時間對放線菌培養濾液拮抗 *S. europaeiscabiei* St1563 能力之影響

本試驗選擇菌株 35-2 與 43-21，進行不同培養時間對放線菌培養濾液拮抗 *S. europaeiscabiei* St1563 能力測定。將具有拮抗能力的 2 株土壤放線菌菌株 (35-2 與 43-21)，分別培養在 LB broth 小量培養 0、7、14 及 21 d 後，取其培養濾液於 ISP-4 培養基上進行對 *S. europaeiscabiei* St1563 之拮抗測試。結果顯示，培養 7、14 及 21 d 的 35-2 菌株濾液皆具有抑制 *S. europaeiscabiei* St1563 生長的效果，抑制效果以培養 7 d 之濾液最佳，抑制圈大小為 4.3 cm；其次為培養 14 及 21 d 之濾液，抑制圈分別為 2.3 及 2.9 cm，兩者之間並無顯著差異；而培養 0 d 之濾液，則無拮抗效果 (表 2)。於 43-21 菌株方面，培養 7 及 14 d 的濾液皆具有拮抗效果，以培養 7 d 之濾液最佳，抑制圈大小為 5.2 cm；其次為培養 14 d 之濾液，抑制圈為 2.3 cm；而培養 0 及 21 d 之濾液則無拮抗效果 (表 2)。

具防治馬鈴薯瘡痂病能力之放線菌菌株鑑定

利用 16S rRNA partial sequence 分析結果

表 2. 不同培養時間之鏈黴菌培養濾液於培養基上對瘡痂病菌 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 之拮抗效果。

Table 2. Effect of culture time for *Streptomyces* isolates 35-2 and 43-21 on antagonistic activity against *Streptomyces europaeiscabiei* St1563.

	Diameter of inhibition zone (cm)	
Culture duration (d)	35-2	43-21
0	0.0 c[z]	0.0 d
7	4.3 a	5.2 a
14	2.3 b	2.3 b
21	2.9 b	0.0 c

[z] Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

顯示，菌株 35-2 之序列與 NCBI 資料庫中 *Streptomyces rochei* strain HBUM174096 (GenBank: EU841560) 相似度為 100%，而菌株 43-21 之序列與 NCBI 資料庫中 *Streptomyces neopeptinius* strain T41 (GenBank: KU324439) 相似度為 99%。根據上述分析結果，分別將菌株 35-2 及 43-21 初步鑑定為鏈黴菌 *S. rochei* (GenBank accession number MN784372) 與 *S. neopeptinius* (GenBank accession number MN784373)。

具拮抗能力鏈黴菌防治馬鈴薯瘡痂病菌之效果

將具有拮抗能力之土壤鏈黴菌菌株 35-2 及 43-21，分別利用培養 7 d 之濾液以土壤澆灌法進行對馬鈴薯瘡痂病防治的溫室試驗。結果顯示，澆灌處理菌株 35-2 之植株瘡痂病罹病度為 28.0%，而澆灌處理菌株 43-21 之植株瘡痂病罹病度為 35.0%，兩處理之罹病度並無顯著差異，但皆明顯低於對照組之罹病度 61.5% (表 3)。由罹病指數分析馬鈴薯薯塊之瘡痂病斑發生程度，可發現對照組中共計 7 顆薯塊的罹病指數 ≥ 4，亦即高達 53.8% (7/13) 的薯塊 90% 以上之表面積皆為病斑覆蓋；而以菌株 35-2 及 43-21 澆灌之植株，則無薯塊之罹病指數 ≥ 4。其中，多數薯塊為 10% 以下之表面積為病斑覆蓋 (表 3)。由此可證實，菌株 35-2 及 43-21 皆可有效降低馬鈴薯瘡痂病之病斑感染面積及罹病度 (圖 1)。

具拮抗能力鏈黴菌之培養濾液對馬鈴薯生長的影響

利用菌株 35-2 及 43-21 之培養濾液澆灌馬鈴薯植株，於處理後 5 wk 收取馬鈴薯之地上部測量其鮮重 (fresh weight)、株高、地下部薯塊鮮重 (tuber weight)，並觀察薯塊表面是否有瘡痂等病斑生成。結果顯示，施用拮抗菌株培養濾液之植株薯塊外觀正常，並無瘡痂病斑生成；施用菌株 35-2 培養濾液之植株鮮重平均為 33.1 g，與對照組的植株平均鮮重為 36.7 g 並無顯著差異；而施用菌株 43-21 培養濾液之植株鮮重平均為 31.8 g，較對照組稍微減少 (表 4)。株高方面，施用拮抗菌株培養濾液與對照組無顯著差異；而施用菌株 35-2 及 43-21 培養濾液之薯塊鮮重分別為 24.9 g 及 25.4 g，與對照組 (15.4 g) 相較則有顯著增加的情形 (表 4)。

表 3. 具拮抗能力之鏈黴菌於溫室防治馬鈴薯瘡痂病之效果。

Table 3. Efficacy of antagonistic *Streptomyces* isolates 35-2 and 43-21 on controlling potato common scab in a greenhouse.

		Disease index[z]						
Treatment	Total number of potato tubes	0	1	2	3	4	5	Disease severity[y] (%)
35-2	15	2	6	6	1	0	0	28.0 b[x]
43-21	16	1	6	5	4	0	0	35.0 b
CK (control)	13	1	2	2	1	4	3	61.5 a

[z] Tubers were evaluated for disease severity on a rating scale: 0: no visible symptoms; 1–4: up to 10%, 40%, 60% and 90% of tuber surface infected, respectively; 5: heavy infections with > 90% of tuber surface infected.

[y] Disease severity (%): [(Σ number of diseased tubes in each disease index × disease index)/(total number of tubes inoculated × 5)] × 100%.

[x] Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's least significant difference (LSD) test.

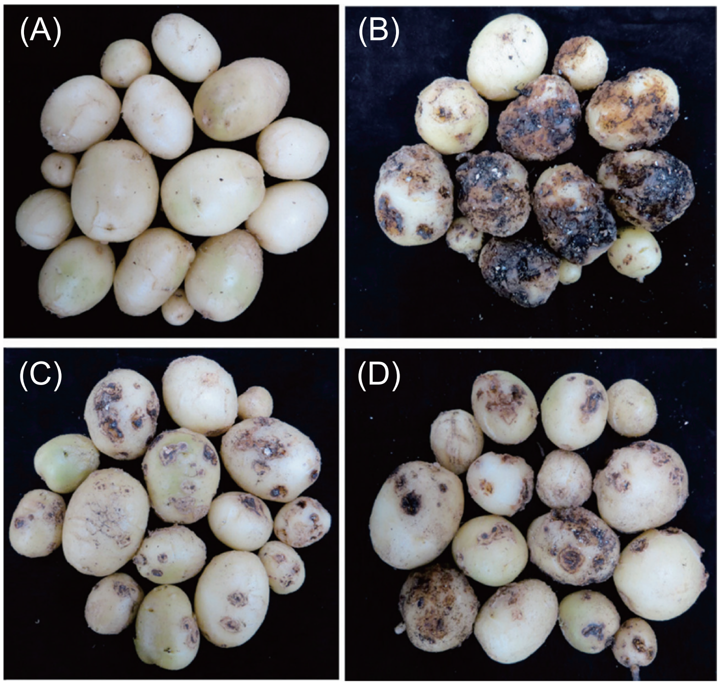

圖 1. 利用土壤拮抗菌於溫室防治馬鈴薯瘡痂病之效果。(A) 無菌水處理之對照組；(B) 接種 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563；(C) 接種 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 並施用拮抗菌 35-2 菌株培養濾液；(D) 接種 *Streptomyces europaeiscabiei* St1563 並施用拮抗菌 43-21 菌株培養濾液。

Fig. 1. Effect of antagonistic actinobacteria on controlling potato common scab in a greenhouse. (A) Mock control; (B) inoculated with *Streptomyces europaeiscabiei* St1563; (C) treated with culture filtrates of 35-2 isolate and inoculated with *Streptomyces europaeiscabiei* St1563; and (D) treated with culture filtrates of 43-21 isolate and inoculated with *Streptomyces europaeiscabiei* St1563.

表 4. 拮抗鏈黴菌之培養濾液對馬鈴薯生長之影響。

Table 4. Effect of culture filtrates from antagonistic *Streptomyces* isolates 35-2 and 43-21 on growth of potato in greenhouse.

Treatment	Fresh weight (g) plant^{-1}	Plant height (cm)	Tuber weight (g) plant^{-1}	Tuber scab symptom
CK (control)	36.7 a^{z}	36.9 a	15.4 b	No
35-2	33.1 a	34.6 a	24.9 a	No
43-21	31.8 b	35.8 a	25.4 a	No

^{z} Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at 5% by Fisher's least significant difference (LSD) test.

討論

馬鈴薯瘡痂病為世界馬鈴薯產區之重要細菌性病害之一，不僅影響馬鈴薯薯塊產量，亦影響外觀及市場價值。本研究自高雄市甲仙、美濃及田寮等地區之土壤分離得到 85 株放線菌菌株，其中 18 株菌株可於 ISP-4 培養基上抑制瘡痂病菌生長。從中選取拮抗性最佳之菌株 35-2 及 43-21，進行放線菌菌液態培養濾液拮抗活性試驗及馬鈴薯瘡痂病防治試驗，結果顯示此 2 株拮抗菌可於培養基上抑制 *S. europaeiscabiei* 之生長，於溫室中亦可有效降低馬鈴薯瘡痂病之罹病度。菌株 35-2 與 43-21 經由 16S rRNA 序列分析比對後，發現分別和 *S. rochei* 與 *S. neopepcinnius* 具有高度的序列相似度。

鏈黴菌廣泛存在於土壤中，為放線菌科 (Actinomycetaceae) 中最大的一屬，已知可藉由抗生、競爭及超寄生等作用機制拮抗植物病原菌 (Schlatter *et al*. 2009)。過去已有研究證實利用 *Streptomyces diastatochromogenes* (Eckwall & Schottel 1997)、*Streptomyces violaceusniger* (Sarwar *et al*. 2019) 及其他無病原性鏈黴菌 (*Streptomyces* spp.) (Ryan *et al*. 2004; Wanner *et al*. 2014) 等作為生物防治菌，皆對 *S. scabies* 具有拮抗的效果。而在其他馬鈴薯瘡痂病病原菌之生物防治研究方面，Hiltunen *et al*. (2009) 指出 *S. griseoviridis* 與鏈黴菌菌株 346 (*Streptomyces strain* 346) 可有效防治 *S. turgidiscabies* 引起之馬鈴薯瘡痂病。此外，Sarwar *et al*. (2018) 之研究證實鏈黴菌 (*Streptomyces* A1RT) 可產生抗生物質 isatropolone C，藉此抑制 *S. europaeiscabiei* 生長，同時也對多種馬鈴薯瘡痂病病菌具有拮抗效果，包含 *S. turgidiscabies*、*S. scabies* 以及 *S. stelliscabiei*。本研究結果也顯示鏈黴菌菌株 35-2 與 43-21 可抑制 *S. europaeiscabiei* 生長，並於溫室試驗中有效降低馬鈴薯之罹病度，具有發展成為防治馬鈴薯瘡痂病之微生物製劑的潛力，未來將於田間進行實際應用並評估其可行性。另外，由於拮抗菌所分泌之酵素或二次代謝物可經由玻璃紙滲透至培養基中，進而抑制病原菌之生長，而培養濾液亦是利用拮抗菌產生的二次代謝物作為抑制病原菌生長之物質。因此，推測本研究篩選之拮抗菌其抗病機制可能為抗生作用，但提供拮抗活性之主要抗生物質為何，則需進一步分析確認。

鏈黴菌除了可作為生物防治菌之外，部分的鏈黴菌更具有促進植物生長或誘導植物產生抗病性的效果 (Schlatter *et al*. 2009)，因此鏈黴菌在生物防治應用上極具潛力。目前研究已證實 *S. rochei* 可作為生物製劑，對多種病原真菌具有防治的效果，如 *Rhizoctonia solani*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 及 *Botryosphaeria dothidea* 等。此外，亦有增加植物根長及植株乾重等促進植物生長的功效 (Kanini *et al*. 2013; Zhang *et al*. 2016; Zamoun *et al*. 2017)。而 *S. neopepcinnius* 可對多種病原真菌表現廣泛性的拮抗效果，如 *Sphaerotheca fusca*、*Aspergillus carbonarius* 及 *Rhizoctonia solani* 等，同時對番茄幼苗等植物的生長具有促進的效果 (Kim *et al*. 2007; Han *et al*. 2008; Goudjal *et al*. 2016)。本研究結果發現，利用鏈黴菌 35-2 與 43-21 菌株培養濾液澆灌之馬鈴薯植株，每株生產薯塊的重量明顯增加。因此，35-2 與 43-21 菌株除了具有拮抗馬鈴薯瘡痂病菌的能力外，亦具有增加馬鈴薯產量的潛力。

生物防治應用於田間時須面對許多挑戰，在不同的生長季節，或是在相同季節中於不同的田區中，生物防治菌之防治效果皆會受到影響。因每個季節及不同地區之環境條件如土壤特性、土壤溼度等都具有差異性，而環境亦會影響病原菌與拮抗菌之生長以及與寄主植物之間的相互作用，且田間微生物相複雜，常導致生物防治菌於施用後難以達到預期之病害防治效果。Wanner *et al*. (2014) 於 4 個不同地區之試驗田進行鏈黴菌對馬鈴薯瘡痂病之生物防治試驗，結果顯示僅有 3 個地區的試驗田能顯著地降低瘡痂病的罹病度，同時也發現馬鈴薯品種亦會影響拮抗菌的防治效果。於所測試的 3 種馬鈴薯品種中，以「育空黃金」(‘Yukon Gold’) 馬鈴薯的防治效果最佳，而對「大西洋」(‘Atlantic’) 馬鈴薯則出現瘡痂病徵更為嚴重的情形。Ryan *et al*. (2004) 利用具拮抗性的鏈黴菌防治馬鈴薯瘡痂病時，亦發現馬鈴薯品種會影響生物防治效果，造成上述現象之原因可能與馬鈴薯品種對病原菌的抗/感病程度有關 (Keinath & Loria 1991)。另外，生物防治菌於田間的使用方式亦會影響其生物防治的效果、栽培者使用的意願及經濟成本；將生物拮抗菌 *S. violaceusniger* 利用土壤澆灌的方式使用，於田間試驗之效果顯著，可降低 83.07% 之馬鈴薯瘡痂病罹病度 (Sarwar *et al*. 2019)，但實務操作上較為耗時費工；而利用介質與生物拮抗菌混拌後再黏附於薯塊表面等方式 (Hiltunen *et al*. 2009) 雖較為簡便，但仍需考慮生物拮抗菌黏附度是否足夠。為了兼顧生物防治菌於田間的使用效果以及栽培者使用上的簡便性，生物防治技術仍需精益求精，未來將對本研究篩選之鏈黴菌菌株 35-2 與 43-21 進行物理及化學等特性分析並研發適合之施用技術，以期能適時、適地且有效地把生物製劑導入作

物病害綜合管理體系中，使其發揮優異的防病功效。

隨著生態環境保護意識的抬頭與消費者對食品安全的追求，擬定友善環境的農業栽培管理策略，以維持農業永續經營已成為近年農業發展的主要目標。其中，推動生物防治技術即是主要的手段之一，本研究所篩選之鏈黴菌 35-2 與 43-21 兼具促進薯塊生長與有效降低馬鈴薯薯塊被瘡痂病菌感染的雙重效果，為具有發展為生物製劑潛能之拮抗菌。

誌謝

本研究工作承洪寶林先生提供土壤樣本及本研究室同仁林江美華小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Arseneault, T., C. Goyer, and M. Filion. 2015. *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 increases potato yield and reduces common scab symptoms in the field. Phytopathology 105:1311–1317. doi:10.1094/PHYTO-12-14-0358-R

Bouchek-Mechiche, K., L. Gardan, P. Normand, and B. Jouan. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: Description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:91–99. doi:10.1099/00207713-50-1-91

Dees, M. W. and L. A. Wanner. 2012. In search of better management of potato common scab. Potato Res. 55:249–268. doi:10.1007/s11540-012-9206-9

Eckwall, E. C. and J. L. Schottel. 1997. Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. J. Ind. Microbiol. Biotech. 19:220–225. doi:10.1038/sj.jim.2900455

Edwards, U., T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, and E. C. Böttger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17:7843–7853. doi:10.1093/nar/17.19.7843

Flores-González, R., I. Velasco, and F. Montes. 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. Plant Pathol. 57:162–169. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01734.x

Goth, R. W., K. G. Haynes, and D. R. Wilson. 1993. Evaluation and characterization of advanced potato breeding clones for resistance to scab by cluster analysis. Plant Dis. 77:911–914. doi:10.1094/PD-77-0911

Goudjal, Y., M. Zamoum, A. Meklat, N. Sabaou, F. Mathieu, and A. Zitouni. 2016. Plant-growth-promoting potential of endosymbiotic actinobacteria isolated from sand truffles (*Terfezia leonis* Tul.) of the Algerian Sahara. Ann. Microbiol. 66:91–100. doi:10.1007/s13213-015-1085-2

Han, J. H., I. C. Hwang, S. H. Cho, C. Jang, N. G. Kim, S. H. Yu, Y. M. Yu, and S. B. Kim. 2008. Description of *Streptomyces neopeptinius* sp. nov., an actinobacterium with broad spectrum antifungal activities. J. Microbiol. 46:295–299. doi:10.1007/s12275-008-0011-8

Hiltunen, L. H., T. Ojanperä, H. Kortemaa, E. Richter, M. J. Lehtonen, and J. P. T. Valkonen. 2009. Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains co-occurring in potato scab lesions. J. Appl. Microbiol. 106:199–212. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03992.x

Hiltunen, L. H., J. Kelloniemi, and J. P. T. Valkonen. 2014. First report of *Streptomyces europaeiscabiei* causing common scab on potato in Finland. Plant Dis. 98:1267. doi:10.1094/PDIS-03-14-0278-PDN

Huang, C. W. 2008. Potato common scab caused by *Streptomyces scabies* in Taiwan- Biological characteristics of the pathogen and an attempted biocontrol by antagonistic *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* WG6-14. Master Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 92 pp. (in Chinese with English abstract)

Kanini, G. S., E. A. Katsifas, A. L. Savvides, and A. D. Karagouni. 2013. *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BioMed Res. Intl. 2013:387230. doi:10.1155/2013/387230

Keinath, A. P. and R. Loria. 1991. Effects of inoculum density and cultivar resistance on common scab of potato and population dynamics of *Streptomyces scabies*. Amer. Potato J. 68:515–524. doi:10.1007/BF02853768

Kim, Y. S., H. M. Kim, C. Chang, I. C. Hwang, H. Oh, J. S. Ahn, K. D. Kim, B. K. Hwang, and B. S. Kim. 2007. Biological evaluation of neopeptins isolated from a *Streptomyces* strain. Pest Manag. Sci. 63:1208–1214. doi:10.1002/ps.1450

Lambert, D. H. and R. Loria. 1989a. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:393–396. doi:10.1099/00207713-39-4-393

Lambert, D. H. and R. Loria. 1989b. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 39:387–392. doi:10.1099/00207713-39-4-387

Larkin, R. P., C. W. Honeycutt, T. S. Griffin, O. M. Olanya, J. M. Halloran, and Z. He. 2011. Effects of different potato cropping system approaches and water management on soilborne diseases and soil microbial communities. Phytopathology 101:58–67. doi:10.1094/PHYTO-04-10-0100

Leiminger, J., M. Frank, C. Wenk, G. Poschenrieder, A. Kellermann, and A. Schwarzfischer. 2013. Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. Plant Pathol. 62:611–623. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02659.x

Lin, C., C. H. Tsai, P. Y. Chen, C. Y. Wu, Y. L. Chang, Y. L. Yang, and Y. L. Chen. 2018a. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. PLoS One 13:e0196520. doi:10.1371/journal.pone.0196520

Lin, C. Y., H. F. Ni, and C. W. Huang. 2018b. First report of common scab on potato caused by *Streptomyces europaeiscabiei* in Taiwan. Plant Dis. 102:818. doi:10.1094/PDIS-05-17-0667-PDN

Meng, Q., L. E. Hanson, D. Douches, and J. J. Hao. 2013. Managing scab diseases of potato and radish caused by *Streptomyces* spp. using *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 and other biomaterials. Biol. Control 67:373–379. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.009

Miyajima, K., F. Tanaka, T. Takeuchi, and S. Kuninaga. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. Intl. J. Syst. Bacteriol. 48:495–502. doi:10.1099/00207713-48-2-495

Ryan, A. D., L. L. Kinkel, and J. L. Schottel. 2004. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. Biocontrol Sci. Technol. 14:301–311. doi:10.1080/09583150410001665187

Sarwar, A., Z. Latif, S. Zhang, J. Zhu, D. L. Zechel, and A. Bechthold. 2018. Biological control of potato common scab with rare Isatropolone C compound produced by plant growth promoting *Streptomyces* A1RT. Front. Microbiol. 9:1126. doi:10.3389/fmicb.2018.01126

Sarwar, A., Z. Latif, S. Zhang, J. Hao, and A. Bechthold. 2019. A potential biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* AC12AB for managing potato common scab. Front. Microbiol. 10:202. doi:10.3389/fmicb.2019.00202

Schlatter, D., A. Fubuh, K. Xiao, D. Hernandez, S. Hobbie, and L. Kinkel. 2009. Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. Microb. Ecol. 57:413–420. doi:10.1007/s00248-008-9433-4

Song, J., S. C. Lee, J. W. Kang, H. J. Baek, and J. W. Suh. 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:203–209. doi:10.1099/ijs.0.02624-0

Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153

Wanner, L. A. 2009. A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. Amer. J. Pot. Res. 86:247–264. doi:10.1007/s12230-009-9078-y

Wanner, L. A., W. W. Kirk, and X. S. Qu. 2014. Field efficacy of nonpathogenic *Streptomyces* species against potato common scab. J. Appl. Microbiol. 116:123–133. doi:10.1111/jam.12336

Zamoum, M., Y. Goudjal, N. Sabaou, F. Mathieu, and A. Zitouni. 2017. Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings. Biocontrol Sci. Technol. 27:723–738. doi:10.1080/09583157.2017.1334257

Zhang, Q., D. Yong, Y. Zhang, X. Shi, B. Li, G. Li, W. Liang, and C. Wang. 2016. *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage. Postharvest Biol. Technol. 115:30–37. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.12.013

Identification and Evaluation of Antagonistic Actinobacteria on Controlling Potato Common Scab

Ching-Yi Lin[1,*], Hui-Fang Ni[2], and Hui-Ju Lin[3]

Abstract

Lin, C. Y., H. F. Ni, and H. J. Lin. 2020. Identification and evaluation of antagonistic actinobacteria on controlling potato common scab. J. Taiwan Agric. Res. 69(2):122–131.

Potato common scab is an economically important disease that is caused by several members of the genus *Streptomyces* in the world. As no effective pesticides and limited results of crop rotation and resistant potato cultivars for managing the disease, this study explored the possibility of using biological control. A total of 85 isolates of actinobacteria were isolated from soil from six different locations in Kaohsiung City. Cellophane paper antibiotic method and bacterial culture filtrates application were conducted to determine antagonistic activity against *Streptomyces europaeiscabiei*. Isolates 35-2 and 43-21 strongly inhibited *S. europaeiscabiei* growth in both assays. When potato plants were drenched with culture filtrates of isolates 35-2 and 43-21, respectively, significantly reduced potato common scab incidence was observed in pot assays. The disease severity was 28% after isolate 35-2 treatment and 35% after isolate 43-21 treatment. In addition, isolates 35-2 and 43-21 increased potato tubers weight in pot assays. These results suggested that isolates 35-2 and 43-21 could provide a dual benefit by decreasing potato common scab disease severity and increasing potato yield as an effective biological control agent. Based on 16S rRNA sequencing analysis, the two antagonistic isolates 35-2 and 43-21 showed a sequence identity of 100% and 99% with *Streptomyces rochei* and *Streptomyces neopeptinius*, respectively.

Key words: Potato common scab, *Streptomyces* spp., Biologic control.

Received: September 5, 2019; Accepted: December 17, 2019.
* Corresponding author, e-mail: eris2024@dns.caes.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
3 Project Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(2):132–146 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202006_69(2).0003

研究報告

台灣地區咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 分離之 *Isaria javanica* CAES1 鑑定與致病性測試

梁鈺平 [1]　王泰權 [1,*]

摘要

梁鈺平、王泰權。2020。台灣地區咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 分離之 *Isaria javanica* CAES1 鑑定與致病性測試。台灣農業研究 69(2):132–146。

本研究自台灣咖啡田間感染真菌死亡的咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 上，分離到蟲生真菌 CAES1，該菌株之菌落為白色至淡黃色或灰色，10–30℃均可生長，25℃菌絲生長速率最快。以光學顯微鏡檢視其無性產孢構造，其分生孢子梗分枝末端著生 1–4 個瓶梗，瓶梗細胞長寬約 3.7–5.0–6.4 μm × 1.9–3.0–3.5 μm，分生孢子串生，形狀呈橢圓形至長橢圓形，大小約為 2.7–3.8–5.4 μm × 1.2–1.6–2.1 μm。以核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacer; ITS)、translation elongation factor-1α gene (TEF1) 及 *β-tubulin* 的核酸序列以最大似然法 (maximum likelihood; ML) 進行親緣關係樹的重建分析，結果顯示本菌株於 3 個基因所重建之親緣關係樹均歸類於 *Isaria javanica* 的支系。因此，根據型態及分子鑑定，本菌株應屬於 *I. javanica*。以 *I. javanica* CAES1 之分生孢子處理咖啡果小蠹，7 d 後之累計死亡率為 100%，而觀察此菌感染後之產孢過程則發現，此菌於咖啡果小蠹死亡後約 2.77 d ± 0.17 d 即可於蟲體表面產生分生孢子。本研究為首篇於台灣之咖啡果小蠹上發現 *I. javanica* 之報告，且本菌對咖啡果小蠹具致病力，未來具有應用於田間防治咖啡果小蠹之潛力。

關鍵詞：咖啡果小蠹、*Isaria javanica*、台灣、生物防治。

前言

咖啡果小蠹 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] (Coleoptera: Curculionidae) 為全球咖啡產區的重要害蟲之一，其雌成蟲於咖啡果實臍部鑽孔後，直接深入種仁產卵繁殖，幼蟲孵化後取食胚乳，直至果實資源殆盡。受害咖啡果於果實發育後期發育不良，且咖啡果小蠹侵入咖啡果實繁殖時，同時會攜入真菌感染生豆內部，造成咖啡生豆品質嚴重下降 (Damon 2000; Vega *et al*. 2009)。如無妥善防治則會造成嚴重損失，據估計每年此害蟲造成全球超過 5 億美元的損失 (Vega *et al*. 2002)。

目前國外主要採用整合防治法 (integrated pest management) 防治咖啡果小蠹，其整合防治方法包括田間耕作防治、監測田間族群量，並於適當時機使用化學防治、釋放寄生性與捕食性天敵、懸掛誘殺陷阱及運用微生物殺蟲劑等 (Aristizábal *et al*. 2012; Aristizábal *et al*. 2016)。台灣目前尚未有任何咖啡果小蠹之推薦藥劑及可供於田間防治之天敵，僅能透過清園及懸掛咖啡果小蠹誘殺器之方法移除田間咖啡果小蠹的孳生源。由於化學防治有環境汙染及誘發害蟲抗藥性之缺點，例如目前國外已有咖啡果小蠹對於安殺番 (endosulfan) 產生抗藥性或是交互抗性的報告 (Brun *et al*. 1990, 1994)，而微生物殺蟲劑則有環境友善、不易造成抗藥性的優勢，且可使咖啡果小蠹在田間染病而造成流行病，顯示開發本土可應用的微

投稿日期：2019 年 9 月 9 日；接受日期：2019 年 12 月 23 日。
[*] 通訊作者：tcw@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

生物防治資材之重要性。

現行於咖啡果小蠹上曾記錄分離到之蟲生真菌，包括白殭菌 *Beauveria bassiana*、黑殭菌 *Metarhizium anisopliae*、*Nomuraea rileyi*、*Isaria amoenerosea* (= *Paecilomyces amoeneroseus*)、*Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*)、*Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*)、*Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*)、*Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*)、*Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) 及 *Hirsutella eleutheratorum* 等 (Samson 1974; Vega *et al*. 1999; Bustillo *et al*. 2002; Wraight *et al*. 2018a; Wraight *et al*. 2018b)，其中，以白殭菌及黑殭菌之應用較為普遍，目前國外已有部分運用白殭菌與黑殭菌商品防治咖啡果小蠹之研究與應用 (De La Rosa-Reyes *et al*. 1995; De La Rosa *et al*. 1997; De La Rosa *et al*. 2000; Samuels *et al*. 2002; Vera *et al*. 2011; Balakrishnan & Prakash 2014)。於國內，作者實驗室目前於台灣之咖啡果小蠹上僅有分離到白殭菌之紀錄 (Liang & Wang 2018)，且尚無於田間實際運用微生物殺蟲劑防治咖啡果小蠹之研究。本研究自嘉義縣中埔鄉之咖啡園採集自然感染蟲生真菌而死亡之咖啡果小蠹，於其上分離到一 *Isaria* 屬之真菌。由於迄今尚無於台灣之咖啡果小蠹上分離到 *Isaria* 屬真菌之紀錄，故本研究描述及記錄此菌之型態及進行分子鑑定，以瞭解其種類及培養特性，並觀察此菌於咖啡果小蠹上之產孢過程，以作為未來利用此菌作為微生物防治之參考。

材料與方法

供試蟲源及蟲生真菌分離

本試驗所使用之咖啡果小蠹蟲源及蟲生真菌，皆採集自嘉義縣中埔鄉無施用化學農藥的咖啡果園。咖啡果小蠹根據 Chu *et al*. (2017) 所描述之人工飼養方式進行大量飼養，試驗時選取活動力較佳之雌成蟲作為試驗蟲源。蟲生真菌採集自咖啡果實臍部染病死亡的咖啡果小蠹雌成蟲，將蟲體以滅菌的鑷子自果實上移出後，以雙面膠黏貼於盛裝馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 [potato dextrose agar medium (PDA), Difco Inc., Detroit, MI, USA] 之塑膠培養皿上蓋內側，使蟲體上之分生孢子自然落下至培養基上，再移植長出之菌落至新的 PDA，所得菌株編號為 CAES1。

菌落形態及菌絲於不同溫度與培養基中之生長速率

將分離株 CAES1 培養於 PDA 上，待其產孢後，將分生孢子分散於 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中，利用血球計數器計算並調整孢子濃度為 10^7 conidia mL^{-1}。將直徑 6 mm 之無菌濾紙片 (Advantec Toyo Ltd., Tokyo, Japan) 置於沙氏葡萄糖瓊脂酵母培養基 [Sabouraud dextrose agar medium with yeast extract (SDAY)；含 40 g L^{-1} dextrose、10 g L^{-1} peptone、10 g L^{-1} yeast extract 及 15 g L^{-1} agar]、麥芽抽出物瓊脂培養基 [malt extract agar medium (MEA)； 含 20 g L^{-1} malt extract、1 g L^{-1} peptone、20 g L^{-1} dextrose 及 15 g L^{-1} agar] 及 PDA 中央，滴加 5 μL CAES1 分生孢子懸浮液於其上，再將培養基置於 10、15、20、25、30 及 35℃之恆溫黑暗培養箱中，14 d 後測量菌落直徑。每處理共 6 重複。

產孢構造

將分離株 CAES1 培養於 PDA 上，於 25℃、黑暗之生長箱中培養 14 d 後，挑取產孢構造懸浮於 0.1% Triton X-100 中，置於玻片上，以干涉位相差 [differential interference contrast (DIC), Nikon, Tokyo, Japan] 顯微鏡觀察，並以 NIS-ElementsBR 3.0 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 拍照後以 ImageJ 軟體測量 50 個以上之瓶梗及分生孢子大小。

分子生物學鑑定

以簡易 NaOH 萃取方式抽取 CAES1 之 DNA (Wang *et al*. 1993)，作為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 之模版，並利用引子對 ITS4/ITS5 增幅核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacer; ITS) (600 bp)、983F/2218R 增幅 translation elongation factor-1α gene (TEF1)

(1,000 bp)，以及 T1/T2、Bt1a/Bt1b、Bt2a/T222 和 T12/T22 增幅 *β-tubulin* 基因片段 (Glass & Donaldson 1995; O'Donnell & Cigelnik 1997; Rehner & Buckley 2005) (表 1)。PCR 反應使用 Fast-Run™ Taq Master kit (波仕特生物科技股份有限公司，台灣台北市)，添加物包括 5× Taq Master Mix 5 µL、引子 (10 pmole μL^{-1}) 各 0.5 µL、ddH_2O 18 µL 及 DNA 模版 1 µL，總共 25 µL。增幅 ITS 序列之 PCR 條件則為 94℃ 1 min，1 個循環；94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 2 min，35 個循環；72℃ 5 min，1 個循環。TEF1 及 *β-tubulin* 則透過遞減式 (touchdown) PCR 方式增幅，反應條件為 94℃ 2 min，1 個循環；94℃ 30 s、66℃ 30 s (每一個循環遞減 1℃)、72℃ 60 s，9 個循環；94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 60 s，33 個循環；72℃ 10 min，1 個循環 (Shimazu & Takatsuka 2010; Gallou *et al*. 2016)。PCR 產物委託源資生物科技公司 (台灣台北市) 進行核酸定序工作，再將所得之序列與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因庫中所登錄之序列進行比對。

親緣關係樹之重建

由於以 NCBI 資料庫比對之結果顯示，CAES1 之 ITS 序列與 *Isaria* 相似度最高，因此本研究親緣關係樹之重建參考 Gallou *et al*. (2016) 進行 *Isaria* 種類鑑別所使用之真菌的 ITS、TEF1 及 *β-tubulin* 序列 (附錄)，將基因序列以 Clustal X2 (Larkin *et al*. 2007) 進行序列比對。再經由 Genedoc 2.7 移除比對後序列的空隔 (gap)，之後以 jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al*. 2012) 測試評估較佳之重建親緣關係樹模型，並以最大似然法 (maximum likelihood; ML) 進行親緣關係樹之模型重建。其中，ITS 及 *β-tubulin* 以 General Time Reversible model 搭配 Gamma Distributed with Invariant Sites，TEF1 則以 Tamura 3-parameter model 搭配 Gamma Distributed，並利用 Mega X (Kumar *et al*. 2018) 進行 1,000 次的 bootstrap 以重建親緣關係樹。

I. javanica CAES1 於咖啡果小蠹的產孢過程

以 *I. javanica* CAES1 分生孢子感染咖啡果小蠹的方法修改自 Vega *et al*. (2008) 之試驗方式，將 *I. javanica* CAES1 培養於 PDA 上，待其產孢後 (約 14 d)，將其分生孢子分散於 0.1% Triton X-100 中，並利用血球計數器計算並調整孢子濃度為 10^8 conidia mL^{-1}。將直徑 6 mm 之無菌濾紙片放入 2 mL 無菌離心管

表 1. 本試驗 polymerase chain reaction (PCR) 及定序使用之引子序列及其標的基因。
Table 1. Primer sets and corresponding amplification targets.

Target gene[z]	Primer	Primer DNA sequence	Size (bp)	Reference
ITS	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	613	Rehner & Buckley (2005)
	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
TEF1	983F	5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'	1,034	Rehner & Buckley (2005)
	2218R	5'-ATGACACCRACRGCRACRGTYTG-3'		
β-tubulin	T1	5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'	647	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T2	5'-TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG-3'		
	Bt1a	5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3'	530	Glass & Donaldson (1995)
	Bt1b	5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3'		
	Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	762	Glass & Donaldson (1995)
	T222	5'-GACCGGGGAAACGGAGACAGG-3'		O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T12	5'-AACAACTGGGCCAAGGGTCAC-3'	807	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T22	5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'		

[z] ITS: internal transcribed spacer; TEF1: translation elongation factor-1α gene.

中，滴加 10 μL 分生孢子懸浮液於濾紙片上，對照組則以無菌水 (含 0.1% Triton X-100) 取代孢子液。將人工飼養之咖啡果小蠹雌成蟲單隻夾入離心管中，再置於 25℃黑暗之生長箱中，之後每日記錄其死亡率。本試驗之試驗組及對照組各處理 40 隻。另外，為計算感染後的產孢時間，以上述相同方式處理 40 隻咖啡果小蠹。其中，5 隻用於拍照記錄 *I. javanica* CAES1 感染咖啡果小蠹後之菌絲生長及產孢過程，其餘 35 隻則用於記錄咖啡果小蠹死亡後 *I. javanica* CAES1 於蟲體表面產生菌絲及孢子所需之時間。真菌生長狀況以實體顯微鏡 (S8APO steromicrscope, Lecia, Wetzlar, Germany) 觀察，搭配 EOS 700D (Canon, Tokyo, Japan) 數位相機及 EOSsight 即時影像測量拍照軟體 (KLO. Co. Ltd, Taipei, Taiwan)，拍攝 *I. javanica* CAES1 於咖啡果小蠹死亡後之菌絲生長及產孢過程。

結果

菌落及產孢構造型態

CAES1 於 SDAY、MEA 及 PDA 三種培養基上之菌落均為白色，其中於 MEA 上菌絲略呈灰色，PDA 上則為淡黃色。SDAY 上菌落邊緣略呈波浪狀，背面黃褐色，PDA 及 MEA 上則菌落邊緣為毛絮狀，背面乳黃色 (圖 1)。3 種培養基中，菌絲生長速率於 SDAY 上最快，而在 6 種測試的溫度中，CAES1 於 10–30℃均可生長，於 25℃生長速率最快。SDAY、MEA 及 PDA 培養 14 d 後之菌落直徑分別為 57.1 mm ± 2.6 mm、46.2 mm ± 1.2 mm 及 47.6 mm ± 1.0 mm，而在 35℃下則 3 種培養基上均無法觀察到可見之菌落 (圖 2)。

以光學顯微鏡檢視 CAES1 培養於 PDA 之無性繁殖構造，其營養菌絲平滑、透明、有隔，寬約 1.9–3.3 μm。分生孢子梗寬約 2.0–3.0 μm，分隔處或末端著生 1–3 個分枝，分枝末

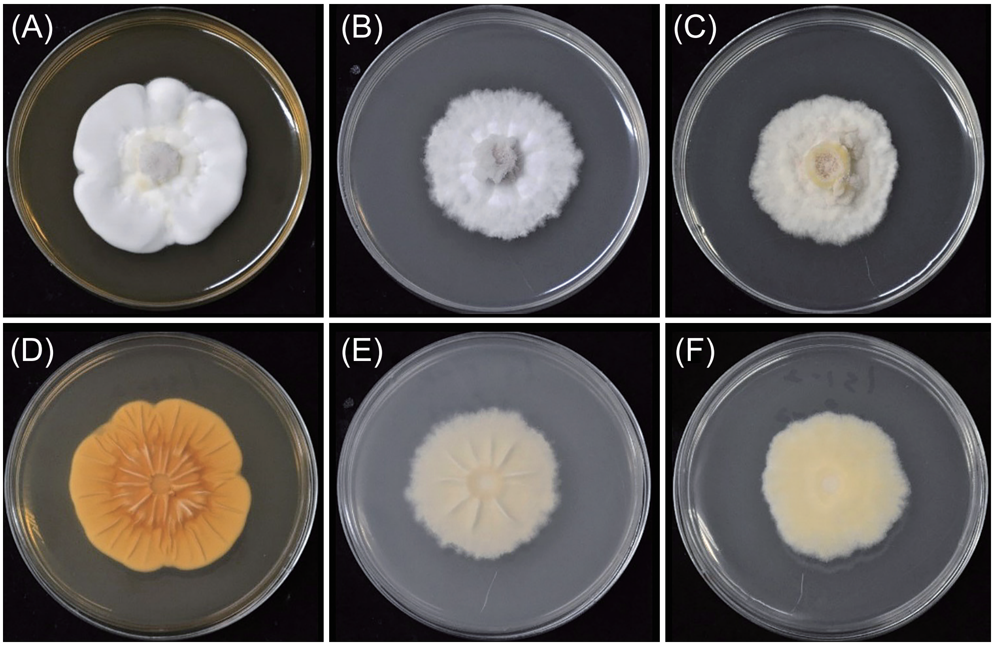

圖 1. *Isaria javanica* CAES1 於 (A、D) 沙氏葡萄糖瓊脂酵母培養基；(B、E) 麥芽抽出物瓊脂培養基；及 (C、F) 馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基培養 14 d (25℃) 後之菌落外觀 (A–C，正面；D–F，背面)。

Fig. 1. Colony morphology of *I. javanica* CAES1 after 14 d at 25℃. Colonies on (A, D) Sabouraud dextrose agar medium with yeast extract; (B, E) malt extract agar; or (C, F) potato dextrose agar (A–C, top view; D–F, reverse view).

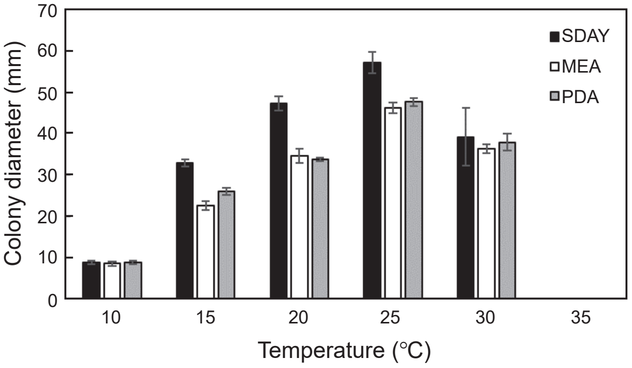

圖 2. *Isaria javanica* CAES1 在不同溫度下於 SDAY、MEA 及 PDA 培養 14 d 後之菌落直徑。

Fig. 2. Growth of *I. javanica* CAES1 at 14 d after culture on Sabouraud dextrose agar medium with yeast extract (SDAY), malt extract agar medium (MEA) and potato dextrose agar medium (PDA) at various temperatures.

端著生 1–4 個瓶梗，或瓶梗直接著生於分生孢子梗末端。瓶梗細胞長約 3.7–5.0–6.4 μm，寬約 1.9–3.0–3.5 μm，基部橢圓形，頂端尖細 (圖 3A)。分生孢子串生，分生孢子呈橢圓形至長橢圓形、單孢、透明、外壁平滑，大小約為 2.7–3.8–5.4 μm × 1.2–1.6–2.1 μm (圖 3B)。

親緣關係樹之重建

本研究利用 ITS、TEF1 及 *β-tubulin* 以最大似然法進行親緣關係樹之重建，結果顯示 CAES1 於 3 種基因所建構的親緣關係樹皆被歸類於 *I. javanica* 的分支 (clade) 內 (圖 4–6)，bootstrap 值分別為 99、98 及 99，且皆與自咖啡果小蠹分離到 *I. javanica* CBS134.22 菌株歸於同一個分支，顯示 CAES1 應屬於 *I. javanica* 的台灣分離株。

I. javanica CAES1 於咖啡果小蠹的產孢過程

以 *I. javanica* CAES1 處理咖啡果小蠹，結果顯示咖啡果小蠹於第 3 天開始出現死亡，至第 7 天之累計死亡率達 100.0%，對照組則均無死亡。觀察咖啡果小蠹死亡後 *I. javanica* CAES1 的產孢過程 (圖 7)，發現咖啡果小蠹死亡 0.83 d ± 0.15 d 後 CAES1 即可於蟲體表面產生細小菌絲 (圖 7B–7C)，此些菌絲會形成更粗的菌絲索，菌絲出現後平均約 1.94 d ± 0.14 d 即可於菌絲上觀察到分生孢子產生 (圖 7D–7E)。整體而言，咖啡果小蠹遭受此菌感染死亡到此菌於蟲體表面產生分生孢子的時間約為 2.77 d ± 0.17 d。

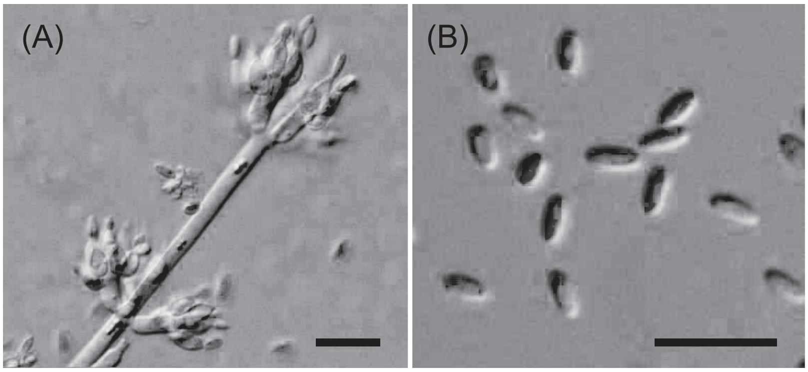

圖 3. *Isaria javanica* CAES1 之 (A) 產孢構造及 (B) 分生孢子 (比例尺 = 10 μm)。

Fig. 3. (A) Conidiogenous structures and (B) conidia of *I. javanica* CAES1 (bar = 10 μm).

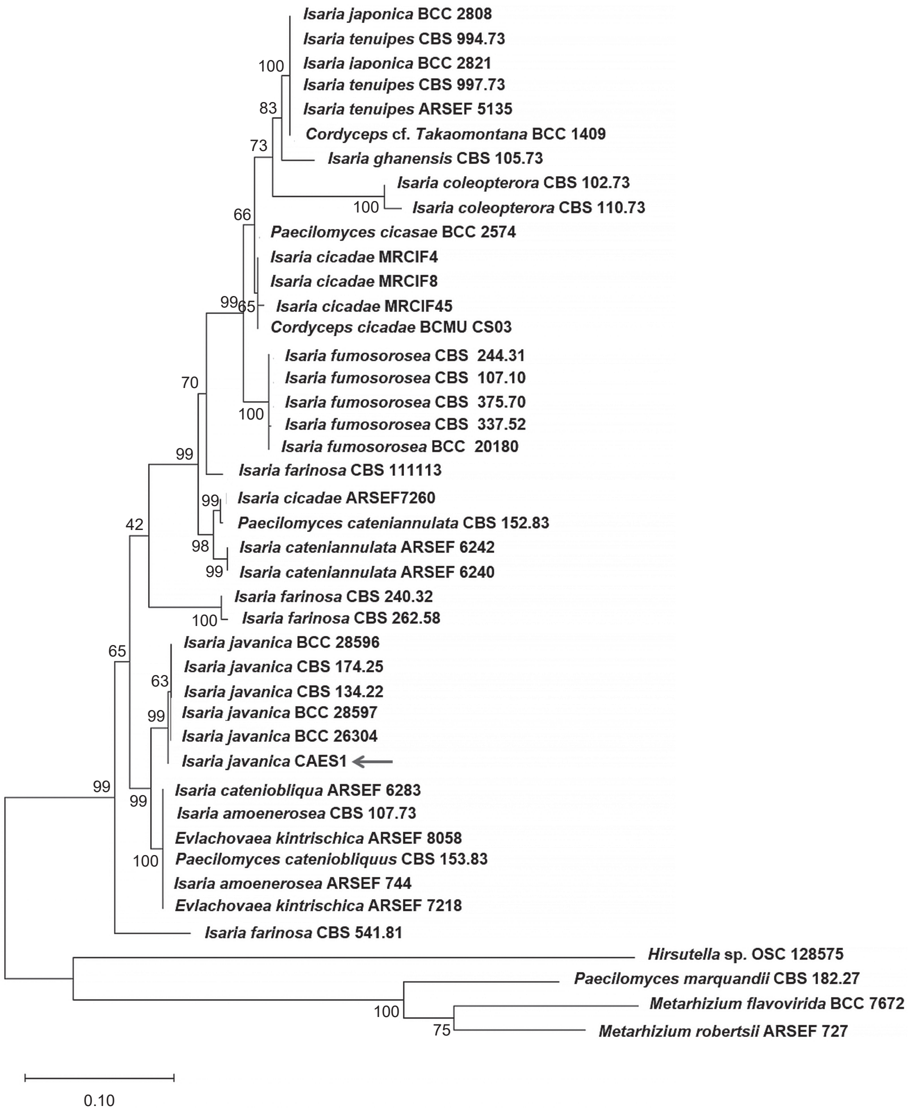

圖 4. 使用核糖體內轉錄區間 (ITS) 序列以最大似然法分析 *Isaria javanica* CAES1 的親緣關係。節點之數字表示分析 1,000 次重複之 bootstrap 值。比例尺代表核苷酸序列置換比率。*Hirsutella* sp. OSC 28575、*Paecilomyces marquandii* CBS 182.27、*Metarhizium flavoviruda* BCC 7672 及 *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 之序列使用作為外群。

Fig. 4. The phylogenetic analysis of *Isaria javanica* CAES1 using internal transcribed spacer (ITS) sequence by maximum likelihood method. The numbers at nodes indicate consensus bootstrap values based on 1,000 replications. Scale bar = 0.10 substitution per nucleotide position. Sequences from *Hirsutella* sp. OSC 28575, *Paecilomyces marquandii* CBS 182.27, *Metarhizium flavoviruda* BCC 7672 and *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 were used as outgroups.

討論

過去文獻對不同之 *I. javanica* 分離株之型態描述，瓶梗大小之描述彼此間不盡相同。Samson (1974)、Tzean *et al*. (1997)、Shimazu & Takatsuka (2010)、Kang *et al*. (2018) 及 Mongkolsamrit *et al*. (2018) 描述之瓶梗形狀較細長，長度分別為 8–14 μm、5.2–11.1 μm、4.6–13.5 μm、7.98 μm ± 2.81 μm 及 6–10

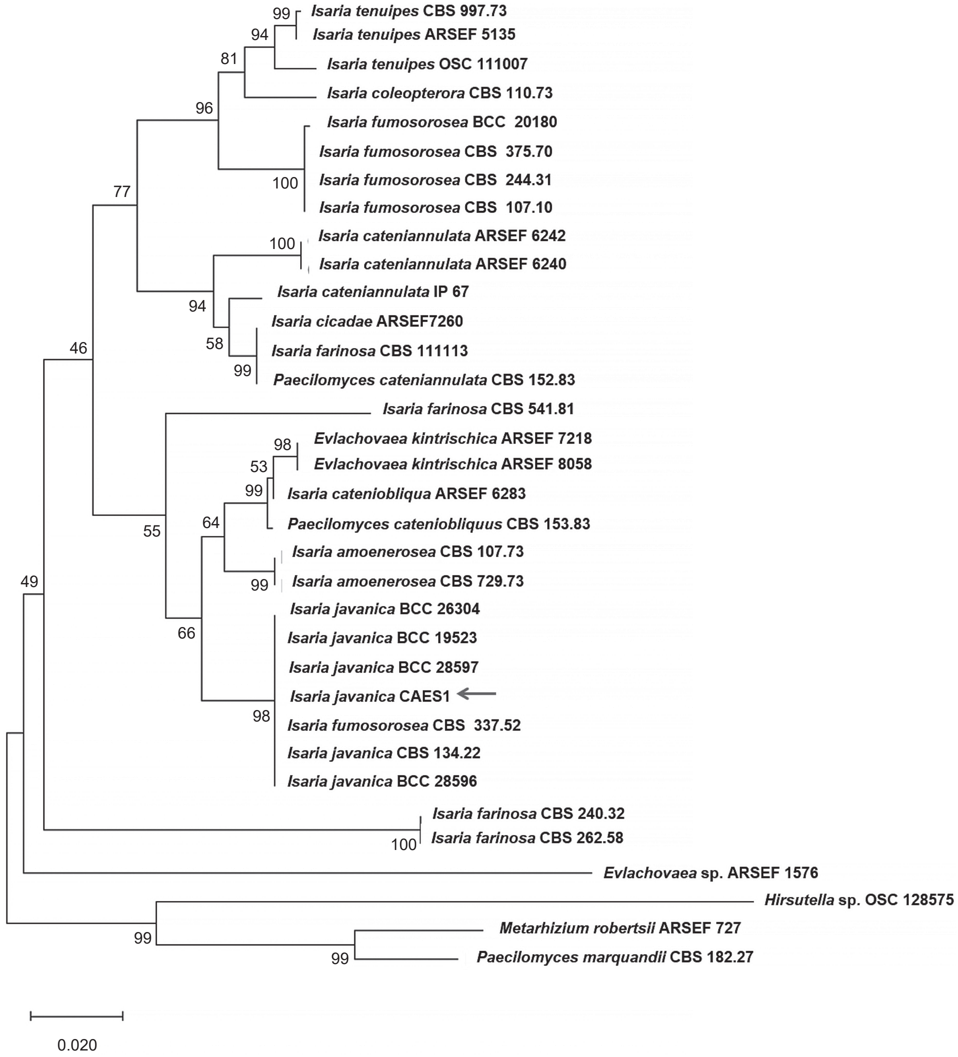

圖 5.　使用 TEF1 以最大似然法分析 *Isaria javanica* CAES1 的親緣關係。節點之數字表示分析 1,000 次重複之 bootstrap 值。比例尺代表核苷酸序列置換比率。*Paecilomyces marquandii* CBS 182.27、*Metarhizium flavoviruda* BCC 7672 及 *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 之序列使用作為外群。

Fig. 5.　The phylogenetic analysis of *Isaria javanica* CAES1 using translation elongation factor-1α gene (TEF1) by maximum likelihood method. The numbers at nodes indicate consensus bootstrap values based on 1,000 replications. Scale bar = 0.05 substitution per nucleotide position. Sequences from *Paecilomyces marquandii* CBS 182.27, *Metarhizium flavovirida* BCC 7672 and *Metarhizium flavovirida* ARSEF 727 were used as outgroups.

μm，而 Cabanillas *et al*. (2013) 及 Gallou *et al*. (2016) 描述之瓶梗長度則較短，各分離株平均之瓶梗長度分別為 4.72–5.64 μm 及 4.81–5.73 μm，與本研究之 *I. javanica* CAES1 分離株較相近。文獻記錄之分生孢子大小彼此間亦有所差異，例如 Samson (1974)、Tzean *et al*. (1997)、Shimazu & Takatsuka (2010) 描述之孢子長寬分別為 5.0–7.4 μm × 1.4–1.7 μm、3.2–5.6 μm × 1.6–2.8μm、3.0–6.3 μm × 1.4–3.2 μm，形狀則為紡錘形至橢圓形。本研究中 CAES1 分生孢子長寬為 2.7–3.8–5.4 μm × 1.2–1.6–2.1 μm，與多數文獻相符合，形狀則較接近橢圓形。不同文獻關於 *I. javanica* 瓶梗及分生孢子之大小描述不盡相同，其原因可

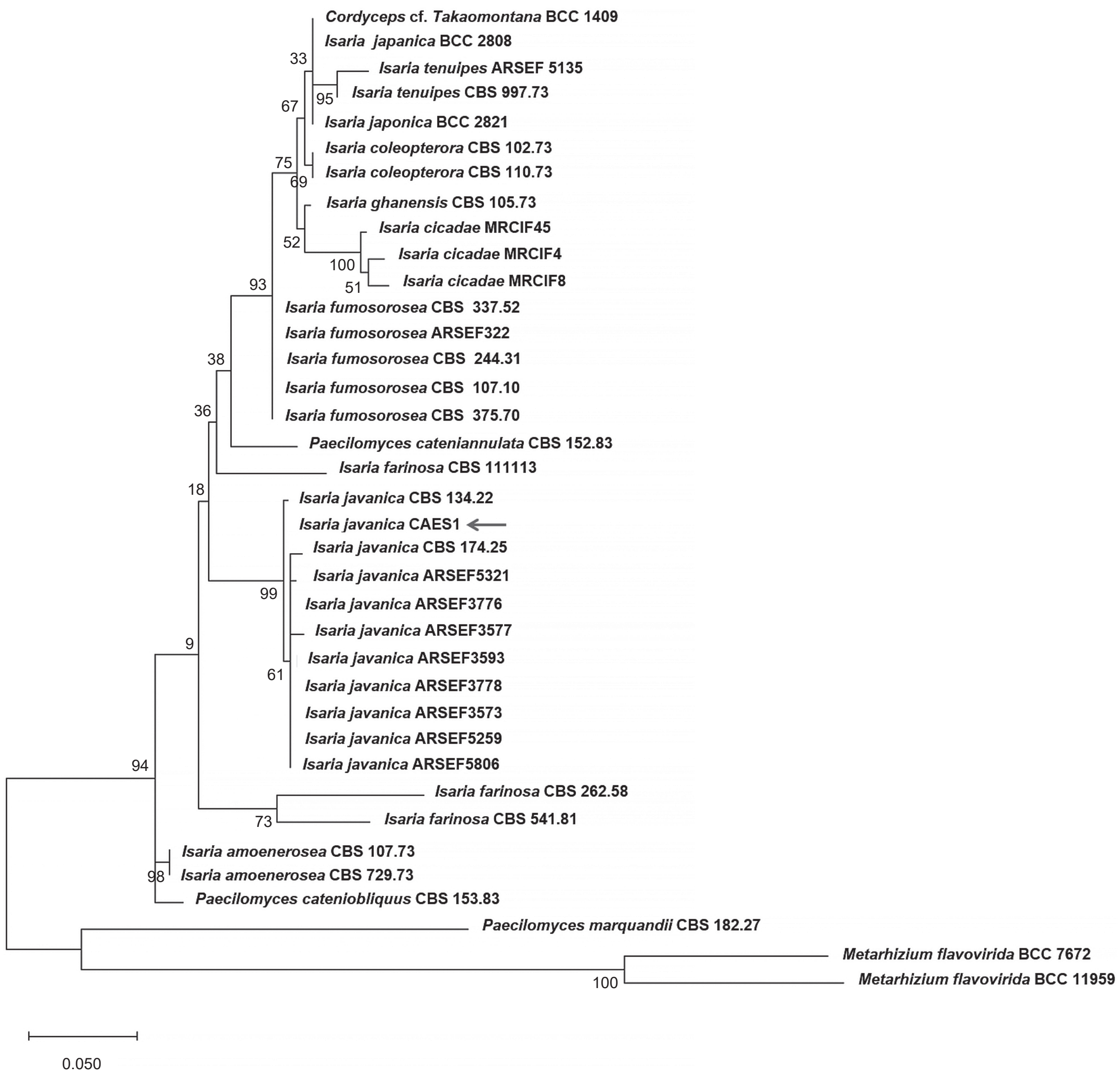

圖 6. 使用 *β-tubulin* 基因以最大似然法分析 *Isaria javanica* CAES1 的親緣關係。節點之數字表示分析 1,000 次重複之 bootstrap 值。比例尺代表核苷酸序列置換比率。*Paecilomyces marquandii* CBS 182.27、*Metarhizium flavoviruda* BCC7672 及 *Metarhizium robertsii* ARSEF727 之序列使用作為外群。

Fig. 6. The phylogenetic analysis of *Isaria javanica* CAES1 using *β-tubulin* by maximum likelihood method. The numbers at nodes indicate consensus bootstrap values based on 1,000 replications. Scale bar = 0.05 substitution per nucleotide position. Sequences from *Paecilomyces marquandii* CBS 182.27, *Metarhizium flavovirida* BCC 7672 and *Metarhizium flavovirida* ARSEF 727 were used as outgroups.

能來自菌株差異，例如 Kang *et al*. (2018) 描述 2 個不同之 *I. javanica* 分離株，其分生孢子長度分別為 4.92 µm ± 1.76 µm 和 7.16 µm ± 1.41 µm，且彼此間有顯著差異。此外，不同培養條件亦可能為造成形態有些微差異之原因，例如 Mongkolsamrit *et al*. (2018) 描述之 *I. javanica* 瓶梗大小，PDA 上為 9.0 µm × 2.0–2.5 µm，MEA 上則為 5–8 µm × 2–3 µm，分生孢子大小於 PDA 上為 4.0 µm × 2.0–2.5 µm，MEA 上則為 5.0–6.5 µm × 2.5 µm。此外，*I. javanica* 之有性世代為 *Cordyceps javanica*，屬於蟲草菌科 (Cordycipitaceae)，會於感染之蟲

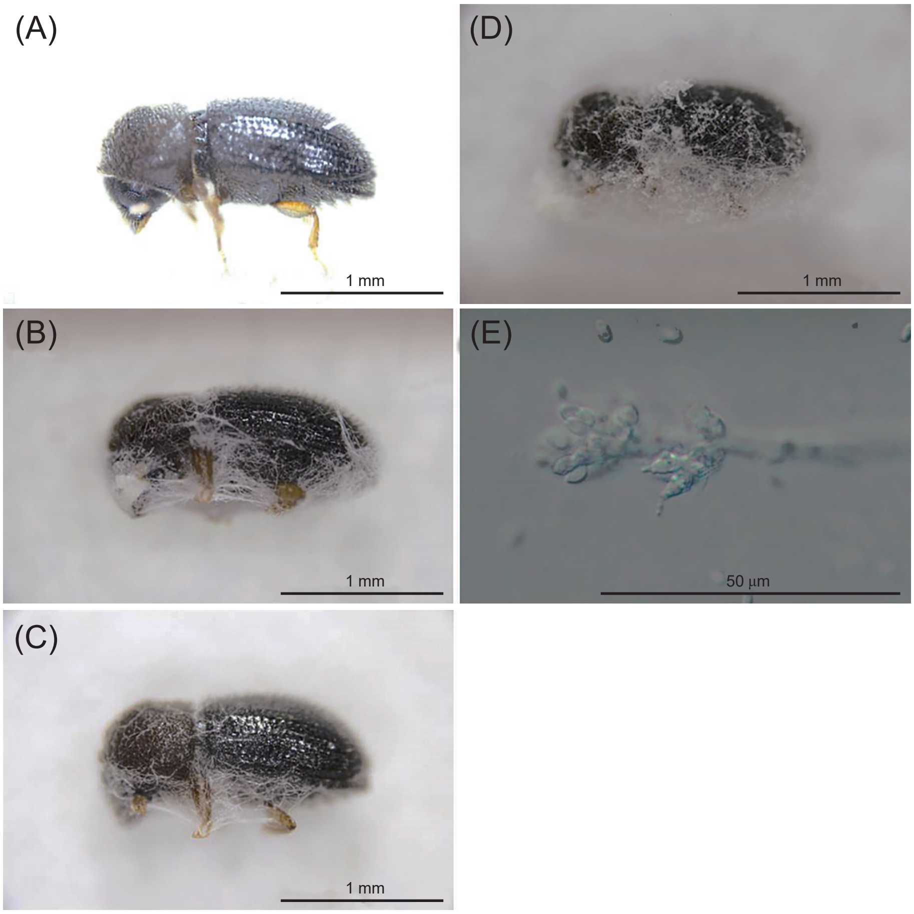

圖 7.　*Isaria javanica* CAES1 感染咖啡果小蠹之菌絲生長及產孢情形。(A–D) 分別為死亡後第 0、1、2、3 d 之蟲體，(E) 為蟲體上產生之產孢構造及孢子。

Fig. 7.　Outgrowth and sporulation of *Isaria javanica* CAES1 on coffee berry borers. (A–D) are cadavers on 0, 1, 2, and 3 d after the coffee berry borer was found dead, and (E) is conidiogenous structures and conidia on the cadaver.

體上產生圓柱形、橘紅色之子座 (stroma)，上有子囊殼 (perithecium) (Mongkolsamrit *et al*. 2018)，但本研究中尚未發現此菌於咖啡果小蠹蟲體上產生有性世代。

Isaria 屬之形態特徵為輪生的瓶梗，瓶梗基部膨大，頂端突然變窄，形成一尖端。分生孢子鏈生，單細胞、透明平滑、近球形或圓柱形，此些形態特徵與其他相近屬之真菌相同，因此過去分類十分紊亂 (Mongkolsamrit *et al*. 2018)。由於用以鑑定 *Isaria* 的型態特徵不甚可靠 (尤其是瓶梗及孢子形狀)，且無法分別自然的分類群 (Luangsa-Ard *et al*. 2005)，故 DNA 序列為目前鑑定 *Isaria* spp. 的重要依據，常用之基因座 (locus) 包括 ITS、nuc 28S rDNA、*TEF1*、*β-tubulin* 基因及 RNA polymerase II subunit (*RPB1* 及 *RPB2*) 等 (Shimazu & Takatsuka 2010; Gallou *et al*. 2016; Mongkolsamrit *et al*. 2018)。本研究使用 ITS、TEF1 及 *β-tubulin* 基因進行親緣關係樹的重建，在 ITS 與 *β-tubulin* 基因所構築的親緣關係樹中，皆顯示本研究所分離到的 *I. javanica* CAES1 被歸於 *I. javanica* 的分支中 (圖 4、圖 6)。其中，TEF1 所重建的親緣關係樹中，雖然 *I. javanica* CAES1 仍然被歸類於 *I. javanica*，但本分支中仍存有一支 *Isaria fumorsorosea* CBS 337.52 (圖 5)。這與 Kepler *et al*. (2017) 利用小單位核醣體

(small subunit; SSU) DNA、大單位核醣體 (large subunit; LSU) DNA、TEF、RBP1 及 RBP 2 所構築的親緣關係樹中，將 *I. fumorsorosea* CBS 337.52 和其他 *I. fumorsorosea* 菌株歸於不同分支、而與 *I. javanica* CBS 134.22 歸屬於同一個分支的情形相同，顯示 *I. fumorsorosea* CBS 337.52 的部分序列可能與 *I. javanica* 較相似。

I. javanica 過去曾於數種寄主上分離到，包括鱗翅目 (Lepidoptera) 之吉普賽舞蛾 (*Lymantria dispar*)、棉花夜蛾 (*Spodoptera littoralis*)，半翅目 (Hemiptera) 之菸草粉蝨 (*Bemisia tabaci*)、銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*)、溫室粉蝨 (*Trialeurodes vaporariorum*)、柑桔木蝨 (*Diaphorina citri*)，以及蛛形綱之節肢動物等 (Scorsetti *et al*. 2007; Shimazu & Takatsuka 2010; Chen 2016; Gallou *et al*. 2016; Mongkolsamrit *et al*. 2018)。台灣過去曾有於銀葉粉蝨分離到 *I. javanica* 之紀錄 (Chen 2016)，且目前關於 *I. javanica* 之研究多為應用於粉蝨防治之研究。本研究首度於台灣之咖啡果小蠹上分離到此菌，以其分生孢子重新感染咖啡果小蠹可使其發病，並可於蟲體表面產生大量分生孢子 (圖 7)。顯示此菌對咖啡果小蠹具致病性，且如應用於田間防治咖啡果小蠹，可於田間再次產生接種源，有機會於田間造成真菌病之流行，然而實際運用之方式及效果仍須更進一步研究。因此，未來仍須更進一步評估 *I. javanica* CAES1 於不同孢子濃度及環境條件下對咖啡果小蠹之防治效果、研發其大量生產方式及於田間施用方式及效果等，以提供農民另一環境友善之防治方法。

誌謝

本研究感謝林怡岑小姐協助咖啡果小蠹的飼養及蟲生真菌致病力試驗，呂宜蓁小姐協助整理親緣關係分類及校對資料，李佳勳先生協助進行分子鑑定工作，許淑麗小姐及蔡佳達先生協助菌絲生長速率試驗，國立台灣大學昆蟲學系保育及演化生物學實驗室曾惠芸助理教授協助親緣關係樹分析，亦感謝中埔福友咖啡農場負責人詹曜威先生提供果園進行咖啡果小蠹採樣及調查。

附錄 本研究於親緣關係樹重建分析所使用之菌株及序列。

Appendix Reference isolate sequences obtained from GenBank for phylogenetic analyses.

	GenBank accession number[z]		
Species and isolate number	ITS	TEF1	*β-tubulin*
Isaria japonica BCC 2821	EU828662	-	AY624242
Isaria japonica BCC 2808	AY624199	-	AY624241
Cordyceps cf. *Takaomontana* BCC 1409	AY624198	-	AY624240
Isaria tenuipes ARSEF 5135	AY624196	JF416020	AY624234
Isaria tenuipes CBS 994.73	AY624187		
Isaria tenuipes CBS 997.73	AY624195	HM161731	AY624233
Isaria tenuipes OSC 111007	-	DQ522349	-
Isaria coleopterora CBS 102.73	AY624176	-	AY624215
Isaria coleopterora CBS 110.73	AY624177	JQ425689	AY624216
Isaria ghanensis CBS 105.73	AY624185	-	AY624223
Cordyceps cicadae BCMU CS03	AB085888	-	-
Paecilomyces cicadae BCC 2574	AY624175	-	-
Isaria cicadae MRCIF4	EU573331	-	EU604136
Isaria cicadae MRCIF45	EU573332	-	EU604138
Isaria cicadae MRCIF8	EU573333	-	EU604137
Isaria cicadae ARSEF 7260	HQ880826	HQ881017	-
Isaria cateniannulata ARSEF 6242	GU734760	GU734759	-
Isaria cateniannulata IP 67	-	GU734753	-
Isaria cateniannulata ARSEF 6240	GU734761	GU734758	-
Paecilomyces cateniannulata CBS 152.83	**AY624172**	**JQ425687**	**AY624211**
Isaria fumosorosea ARSEF 322	-	-	EF585301
Isaria fumosorosea CBS 375.70	AY624183	HM161736	AY624221
Isaria fumosorosea CBS 244.31	AY624182	JQ425690	AY624220
Isaria fumosorosea CBS 107.10	**AY624184**	**HM161735**	**AY624222**
Isaria fumosorosea CBS 337.52	EF411219	MF416500	EF411239
Isaria fumosorosea BCC 20180	JQ425655	JQ425669	-
Isaria javanica BCC 19523	-	JQ425670	-
Isaria javanica BCC 28596	JQ425661	JQ425679	-
Isaria javanica BCC 28597	JQ425662	JQ425680	-
Isaria javanica BCC 26304	JQ425660	JQ425677	-
Isaria javanica CBS 134.22	**DQ403723**	**JQ425683**	**EF585304**
Isaria javanica CBS 174.25	MH854836		EF585302
Isaria javanica ARSEF 5321			FJ899919
Isaria javanica ARSEF 3577			FJ899914
Isaria javanica ARSEF 3776			FJ899916
Isaria javanica ARSEF 5259	-	-	FJ899918
Isaria javanica ARSEF 3778	-	-	FJ899917
Isaria javanica ARSEF 5806	-	-	EF585306
Isaria javanica ARSEF 3593	-	-	FJ899915
Isaria javanica ARSEF 3573	-	-	FJ899913

附錄 本研究於親緣關係樹重建分析所使用之菌株及序列 (續)。

Appendix Reference isolate sequences obtained from GenBank for phylogenetic analyses. (continued)

	GenBank accession number[z]		
Species and isolate number	ITS	TEF1	*β-tubulin*
Isaria javanica CAES1 (This study)	MN094459	MN215883	MN215882
Isaria catenioblíqua ARSEF 6283	GU734763	GU734749	-
Paecilomyces catenioblíquus CBS 153.83	**AY624173**	**JQ425688**	**AY624212**
Isaria amoenerosea CBS 107.73	AY624168	MF416494	AY624207
Isaria amoenerosea CBS 729.73		HM161732	AY624208
Isaria amoenerosea ARSEF 744	EU553281	-	-
Isaria farinosa CBS 111113	AY624181	MF416499	AY624219
Isaria farinosa CBS 541.81	AY624180	JQ425686	AY624218
Isaria farinosa CBS 240.32	AY624178	JQ425684	-
Isaria farinosa CBS 262.58	AY624179	JQ425685	AY624217
Evlachovaea kintrischica ARSEF 8058	GU734764	GU734750	-
Evlachovaea kintrischica ARSEF 7218	EU553278	GU734751	-
Evlachovaea sp. ARSEF 1576	-	GU734746	-
Hirsutella sp. OSC 128575	JN049845	EF469064	-
Paecilomyces marquandii CBS 182.27	AY624193	EF468793	AY624229
Metarhizium flavoviride BCC 7672	AY624203	-	AY624248
Metarhizium flavoviride BCC 11959	-	-	AY624249
Metarhizium robertsii ARSEF 727	HQ331453	DQ463994	-

[z] ITS: internal transcribed spacer; TEF1: translation elongation factor-1α gene. Boldface type indicates ex-type specimens.

引用文獻

Aristizábal, L. F., O. Lara, and S. P. Arthurs. 2012. Implementing an integrated pest management program for coffee berry borer in a specialty coffee plantation in Colombia. J. Integr. Pest Manag. 3:G1–G5. doi:10.1603/IPM11006

Aristizábal, L. F., A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2016. Integrated pest management of coffee berry borer: Strategies from Latin America that could be useful for coffee farmers in Hawaii. Insects 7:6. doi:10.3390/insects7010006

Balakrishnan, M. M. and R. N. Prakash. 2014. Infectivity of ten *Metarhizium anisopliae* isolates to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). J. Entomol. Zool. Studies 2:246–249.

Brun, L. O., C. Marcillaud, V. Gaudichon, and D. M. Suckling. 1990. Monitoring of endosulfan and lindane resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. Bull. Entomol. Res. 80:129–135. doi:10.1017/S0007485300013341

Brun, L. O., C. Marcillaud, V. Gaudichon, and D. M. Suckling. 1994. Cross resistance between insecticides in coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from New Caledonia. Bull. Entomol. Res. 84:175–178. doi:10.1017/S0007485300039651

Bustillo, A. E., R. Cardenas, and F. J. Posada. 2002. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. Neotrop. Entomol. 31:635–639. doi:10.1590/S1519-566X2002000400018

Cabanillas, H. E., J. H. de Leon, R. A. Humber, K. D. Murray, and W. A. Jones. 2013. *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. Mycoscience 54:158–169. doi:10.1016/j.myc.2012.09.009

Chen, Y. 2016. The efficacy of the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica* (Ascomycota: Hypocreales), as a biocontrol agent for management of the whitefly, *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring). Master Thesis, Department of Entomology, National Chung Hsing University. Taichung. Taiwan. 48 pp. (in Chinese with English abstract)

Chu, Y. F., M. H. Yang, S. F. Chang, P. H. Chen, and T. C. Wang. 2017. The composition of life stages of coffee berry borer (Scolytidae: *Hypothenemus hampei*) in the coffee berry and the control efficacy of different insecticides for the pest. J. Taiwan Agri. Res. 66:318–325. doi:10.6156/JTAR/2017.06604.06

Damon, A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bull. Entomol. Res. 90:453–465. doi:10.1017/S0007485300000584

Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9:772. doi:10.1038/nmeth.2109

De La Rosa, W., R. Alatorre, J. Trujillo, and J. F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). J. Econ. Entomol. 90:1534–1538. doi:10.1093/jee/90.6.1534

De La Rosa, W., R. Alatorre, J. F. Barrera, and C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93:1409–1414. doi:10.1603/0022-0493-93.5.1409

De La Rosa-Reyes, W., J. L. Godinez-Aguilar, and R. Alatorre-Rosas. 1995. Biological activity of five strains of *Metarhizium anisopliae*, upon the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Col.: Scolytidae). Entomophaga 40:403–412. doi:10.1007/BF02373728

Gallou, A., M. G. Serna-Domínguez, A. M. Berlanga-Padilla, M. A. Ayala-Zermeño, M. A. Mellín-Rosas, R. Montesinos-Matías, and H. C. Arredondo-Bernal. 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. Fungal Biol. 120:414–423. doi:10.1016/j.funbio.2015.11.009

Glass, N. L. and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61:1323–1330.

Kang, B. R., J. H. Han, J. J. Kim, and Y. C. Kim. 2018. Dual biocontrol potential of the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica*, for both aphids and plant fungal pathogens. Mycobiology 46:440–447. doi:10.1080/12298093.2018.1538073

Kepler, R. M., J. J. Luangsa-ard, N. L. Hywel-Jones, C. A. Quandt, G. H. Sung, S. A. Rehner, M. C. Aime, T. W. Henkel, T. Sanjuan, R. Zare, M. Chen, Z. Li, A. Y. Rossman, J. W. Spatafora, and B. Shrestha. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). IMA Fungus 8:335–353. doi:10.5598.imafungus.2017.08.02.08

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404

Liang, Y. P. and T. C. Wang. 2018. Preliminary study of virulence of *Beauveria bassiana* isolates from Taiwan against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). p.85. *in*: The 39th Annual Meeting of Taiwan Entomological Society. October 20–21, 2018. Tainan, Taiwan. Taiwan Entomol. Soc. Publ., Taipei. (in Chinese)

Luangsa-Ard, J. J., N. L. Hywel-Jones, L. Manoch, and R. A. Samson. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. Isarioidea species. Mycol. Res. 109:581–589. doi:10.1017/S0953756205002741

Mongkolsamrit, S., W. Noisripoom, D. Thanakitpipattana, T. Wutikhun, J. W. Spatafora, and J. Luangsa-Ard. 2018. Disentangling cryptic species with isaria-like morphs in Cordycipitaceae. Mycologia 110:230–257. doi:10.1080/00275514.2018.1446651

O'Donnell, K. and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol. Phylogenet. Evol. 7:103–116. doi:10.1006/mpev.1996.0376

Rehner, S. A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia 97:84–98. doi:10.1080/15572536.2006.11832842

Samson, R. A. 1974. Paecilomyces and some allied hyphomycetes. Stud. Mycol. 6:1–119.

Samuels, R. I., R. C. Pereira, and C. A. T. Gava. 2002. Infection of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Biocontrol Sci. Technol. 12:631–635. doi:10.1080/0958315021000016298

Scorsetti, A. C., R. A. Humber, C. De Gregorio, and C. C. L. Lastra. 2007. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. Biocontrol 53:787. doi:10.1007/s10526-007-9118-9

Shimazu, M. and J. Takatsuka. 2010. *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. Appl. Entomol. Zool. 45:497–504. doi:10.1303/aez.2010.497

Tzean, S. S., L. S. Hsieh, and W. J. Wu. 1997. Atlas of Entomopathogenic Fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 214 pp.

Vega, F. E., G. Mercadier, and P. F. Dowd. 1999. Fungi associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). p.229–238. *in*: Proceedings of the 18th International Scientific Colloquium on Coffee. August 2–6, 1999. Helsinki, Finland. Association for Science and Information on Coffee, Paris.

Vega, F. E., R. A. Franqui, and P. Benavides. 2002. Scientific note: The presence of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Puerto Rico: Fact or fiction? J. Insect Sci. 2:13. doi:10.1093/jis/2.1.13

Vega, F. E., F. Posada, M. C. Aime, M. Pava-Ripoll, F. Infante, and S. A. Rehner. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. Biol. Control 46:72–82. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.008

Vega, F. E., F. Infante, A. Castillo, and J. Jaramillo. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A short review, with recent findings and future research directions. Terr. Arthropod Rev. 2:129–147. doi:10.1163/187498209X12525675906031

Vera, J. T., E. C. Montoya, P. Benavides, and C. E. Góngora. 2011. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) emerging from fallen, infested coffee berries on the ground. Biocontrol Sci. Technol. 21:1–14. doi:10.1080/09583157.2010.517605

Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153

Wraight, S. P., S. Galaini-Wraight, R. L. Howes, L. A. Castrillo, R. I. Carruthers, R. H. Smith, T. K. Matsumoto, and L. M. Keith. 2018a. Prevalence of naturally-occurring strains of *Beauveria bassiana* in populations of coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawai'i Island, with observations on coffee plant-*H. hampei*-*B. bassiana* interactions. J. Invertebr. Pathol. 156:54–72. doi:10.1016/j.jip.2018.07.008

Wraight, S. P., S. Galaini-Wraight, L. A. Castrillo, M. H. Griggs, L. M. Keith, and T. K. Matsumoto. 2018b. Collection, isolation, *in vitro* culture, and laboratory transmission of *Hirsutella eleutheratorum* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) from coffee berry borer on Hawai'i Island. J. Invertebr. Pathol. 157:53–66. doi:10.1016/j.jip.2018.08.002

Identification and Pathogenicity of *Isaria javanica* CAES1 Isolated from the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) in Taiwan

Yu-Ping Liang[1] and Tai-Chuan Wang[1,*]

Abstract

Liang, Y. P. and T. C. Wang. 2020. Identification and pathogenicity of *Isaria javanica* CAES1 isolated from the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 69(2):132–146.

An isolate of entomopathogenic fungi, CAES1, was isolated from a naturally infected coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*; CBB) in a coffee field in Taiwan. Colonies of CAES1 were white to pale-yellow or grey. Mycelia could grow in range of 10℃ to 30℃, with the optimal temperature at 25℃, ranging from 10℃ to 30℃. The conidiophores formed branches with phialides in whorls of 1 to 4, with phialides 3.7–5.0–6.4 μm × 1.9–3.0–3.5 μm, and conidia forming in chain, 2.7–3.8–5.4 μm × 1.2–1.6–2.1 μm. CAES1 was identified as *Isaria javanica* based on morphology and phylogenetic analysis of the sequences of ribosomal internal transcribed spacer (ITS), translation elongation factor-1α (TEF1) and *β-tubulin*. The cumulative mortality rate of CBB was 100% on the 7th day after treated with conidia of *I. javanica* CAES1. *I. javanica* CAES1 sporulated on the surface of CBB 2.77 d ± 0.17 d after CBB died. This is the first record of *I. javanica* from CBB in Taiwan. It is suggested that *I. javanica* CAES1 is pathogenetic to the CBB and could be a potential biocontrol agent against CBB in the future.

Key words: Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), *Isaria javanica*, Taiwan, Biological control.

Received: September 9, 2019; Accepted: December 23, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: tcw@dns.caes.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(2):147–153 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202006_69(2).0004

研究報告

檬果壯鋏普癭蚋之天敵 *Aprostocetus* sp. (膜翅目：釉小蜂科) 寄生策略及日律活動

林聖豐[1] 李奕萱[2] 劉珈琳[2] 楊曼妙[3] 郝秀花[4,*]

摘要

林聖豐、李奕萱、劉珈琳、楊曼妙、郝秀花。2020。檬果壯鋏普癭蚋之天敵 *Aprostocetus* sp. (膜翅目：釉小蜂科) 寄生策略及日律活動。台灣農業研究 69(2):147–153。

生物防治被視為具有高度專一性且低環境汙染性的防治方式，特別是對蛀食害蟲、造癭害蟲或危害徵狀不明顯及難以確認危害位置的害蟲。本研究針對檬果壯鋏普癭蚋 (*Procontarinia robusta* Li, Bu & Zhang) 之寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 進行生殖策略、增放試驗、不同顏色黏蟲板吸引測試及日律活動進行試驗，以評估寄生蜂的生物防治效益。結果顯示 *Aprostocetus* sp. (1) 雌雄性比為 0.72 : 1；(2) 具孤雌生殖能力；及 (3) 人為施放寄生蜂可提高寄生率，顯示此寄生蜂物種可作為良好的防治資材。黃色黏蟲板對寄生蜂的吸引效力高於其他顏色黏蟲板，但若加上模擬蟲癭的黑點，則以淡綠色黏蟲板的吸引力最高。反映 *Aprostocetus* sp. 不僅受顏色吸引，亦受蟲癭存在與否影響。日律調查顯示，10–12 時及 12–14 時吸引寄生蜂之數量無顯著差異，然兩者均較 8–10 時、14–16 時及 16–18 時等三個時段的吸引數量高，推測 10–14 時為 *Aprostocetus* sp. 主要的寄生時期。本研究建議施用化學藥劑的時機，可避開此時段，大幅降低藥劑防治與天敵防治的效益衝突。

關鍵詞：檬果、監測、黏蟲紙、生物天敵、台灣。

前言

檬果壯鋏普癭蚋 (*Procontarinia robusta* Li, Bu & Zhang) 於 2011 年入侵台灣 (Shih *et al*. 2013)，其於葉片引發蟲癭並於離癭時所造成葉片的傷口，不但會降低可行光合作用之葉片面積，也易使其他病菌由葉片傷口感染植株，進而降低果實產量及弱化檬果樹勢。對此害蟲，台灣目前仍以化學藥劑作為主要防治方式，為了發展對農業環境友善與永續經營的檬果害蟲管理策略，需仰賴害蟲綜合防治管理 (Integrated Pest Management; IPM) 作為防治發展的核心價值。此管理方式需妥善導入多項適當的防治方式法，以降低彼此間的干擾影響，將害蟲族群及數量控制在經濟危害水平之下 (Pedigo *et al*. 1986; Pedigo & Higley 1996; Kogan 1998)。

黏蟲紙是監測癭蚋害蟲的採樣方法，如 Hallett *et al*. (2007) 以黏蟲紙監測甘藍癭蚋 *Contarinia nasturtii* (Kieffer) 發生時期、Muhammad *et al*. (2013) 以藍、綠、橘、粉紅、紅、紫、白、黃等不同顏色黏蟲紙，測試其吸引檬果癭蚋 *Procontarinia mangicola* (Shi) 成蟲的效力。但此監測及防治手段是否影響其他防治方法，則鮮有研究提及，如癭蚋害蟲之寄生蜂是否亦受黏蟲紙吸引，進而降低寄生蜂族群量及干擾整體寄生效力？此外，化學防治 (藥劑) 為傳統慣行農法最常見使用的防治方

投稿日期：2019 年 10 月 4 日；接受日期：2019 年 12 月 24 日。
[*] 通訊作者：hao@fthes-tari.gov.tw
[1] 國立中興大學昆蟲學系博士生。台灣 台中市。
[2] 高雄市立明華國中學生。台灣 高雄市。
[3] 國立中興大學昆蟲學系教授。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。

法，但其對於寄生蜂族群的影響則難以評估。針對此狀況，或可藉由調查寄生蜂的日律時段，開發一種可使其主要活動時間與藥劑施用時段錯開的方法，以降低藥劑對於天敵寄生蜂的負面影響。

檬果壯鋏普癭蚋的 IPM 發展有賴多種防治方法之整合，進而評估最佳的防治手段。就目前而言，檬果壯鋏普癭蚋的研究報告仍不多見，僅含其生物學相關報告 (Cai *et al*. 2013; Zeng *et al*. 2014; Lin *et al*. 2018) 及一篇寄生蜂天敵 *Aprostocetus* sp. 的生物學資料 (Lin *et al*. 2019)。其中，Lin *et al*. (2019) 指出寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 於自然園區的寄生率為 10–19%，可作為良好的防治資材，但其寄生特性及人為施放之效力仍需進行確認。

本研究針對檬果壯鋏普癭蚋的寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 進行 (1) 雌雄性比；(2) 寄生行為；(3) 人為施放寄生蜂試驗；(4) 多種色系黏蟲板對寄生蜂之影響；以及 (5) 寄生蜂日律活動等之調查，以研擬符合友善環境之檬果壯鋏普癭蚋害蟲綜合防治管理策略。

材料與方法

調查區域及檬樹

檬果取樣地區及檬樹包含高雄市立明華國民中學校園 (N22.661338, E120.301073，以下稱學校樣點) 檬樹 4 棵及鳳山熱帶園藝試驗分所 (N22.642635, E120.358871，以下稱農試所樣點) 檬樹 36 棵，樹高約 1.5–3.0 m，檬樹葉片之著癭數量平均每葉超過 60 個蟲癭。

黏蟲板干擾試驗

選擇長寬為 10 cm × 4 cm 大小之七種色板 (紙博館，台灣台中市)，顏色模擬葉片不同物候時期，分別為剛抽梢葉片 (桃紅色，RGB 色碼：f55b97)、剛抽梢新葉 (紅色，RGB 色碼：ea423f)、新梢葉 (翠綠色，RGB 色碼：92d46a)、較成熟葉 (淡綠色，RGB 色碼：01 bd69)、成熟葉 (綠色，RGB 色碼：017b52)、田野對照組 (黃色，RGB 色碼：f9da05；藍色，RGB 色碼：2573d5)。每種顏色分為純底色及加上模擬蟲癭黑點，共 12 片，塗抹上蟲膠 (農友種苗股份有限公司，台灣高雄市)，以鐵絲懸掛於具有蟲癭檬果葉附近。1 wk 後將黏蟲板取回，計算色紙上的寄生蜂數量，進行 3 重覆，以軟體 PAST 3.06 (Hammer *et al*. 2001) 針對不同顏色組別進行杜凱確實差異檢定 [Tukey’s Honestly Significant Difference (HSD) Test] 及針對相同顏色有/無蟲癭組別進行 *t* 檢定 (*t*-test)。

寄生蜂的日律週期

選擇長寬為 10 cm × 4 cm 黃色色板，並塗上蟲膠，懸掛於枝條。調查時間為 8:00–18:00，每 2 h 更換 1 次新的黏板，計算其上寄生蜂數量，進行 3 重覆，再以軟體 PAST 3.06 (Hammer *et al*. 2001) 進行 Kruskal-Wallis 檢定。

Aprostocetus sp. 生殖策略

選取具初期發育蟲癭的檬果葉 3 片，以網袋包覆避免寄生蜂寄生，待初期蟲癭發展至 2–3 期時，置入 4 隻處女雌蜂。5 wk 後，解剖蟲癭並藉由寄生與否確認其是否具孤雌生殖現象。處女雌蜂的準備，由解剖野外檬果壯鋏普癭蚋之蟲癭，取得寄生蜂裸蛹，置於養蟲小方格飼養盒各別飼養至成蟲。此外，記錄黏蟲板試驗誘集之寄生蜂性別及數量。

人為施放 *Aprostocetus* sp. 試驗

根據 Lin *et al*. (2018) 對於檬果壯鋏普癭蚋的蟲癭發育時期界定，作為本項試驗的蟲癭時期判定方法。此外，Lin *et al*. (2019) 指出 *Aprostocetus* sp. 無法於初始形成期的蟲癭進行寄生，故選取階段為初始形成期的著癭葉 3 片，以網袋包覆。待蟲癭發育至第 2–3 期 (成長分化期及定型成熟期)，將各個網袋置入野外蒐集之雌蜂 5 隻。另設置對照組 (以網袋包覆初始形成期的著癭葉 3 片，不置入寄生蜂) 與自然寄生組 (著癭葉 3 片，於第 3 期才進行網袋包覆)，待所有組別癭蚋羽化後，計算袋內的癭蚋羽化數與寄生數。比較寄生蜂對癭蚋族群抑制效果，針對不同組別寄生率以軟體 PAST 3.06 (Hammer *et al*. 2001) 進行 Shapiro-Wilk 常態分布及 *t* 檢定。

結果

不同顏色黏蟲板對於 *Aprostocetus* sp. 之干擾

無黑點之各色黏蟲板間，黃色黏蟲板誘集寄生蜂的數量顯著高於其他各色黏蟲板。具黑點各色黏蟲板間，淡綠色黏蟲板誘集寄生蜂的數量顯著高於其他顏色的黏蟲板 (圖 1)。

同色黏蟲板間，除藍色及紅色黏蟲板的誘集寄生蜂的數量，不受是否具有黑點影響外，其他顏色組別均呈現顯著性差異。具黑點之翠綠、青綠色及綠色黏蟲板的寄生蜂誘集數量較不具黑點者高。桃紅色及黃色黏蟲板則反之，不具黑點之誘集數量較具黑點者高。

Aprostocetus sp. 之日律週期

寄生蜂成蟲之日律顯示，10–12 時及 12–14 時兩個時段的寄生蜂誘集數量，顯著高於其他 3 個時段 (8–10時、14–16時及16–18時)，但兩時段的寄生蜂誘集數量，則無顯著差異 (圖 2)。

Aprostocetus sp. 生殖策略

Aprostocetus sp. 的孤雌生殖測試顯示，在 516 個蟲癭中，共計取得 42 隻雄性個體，0 隻

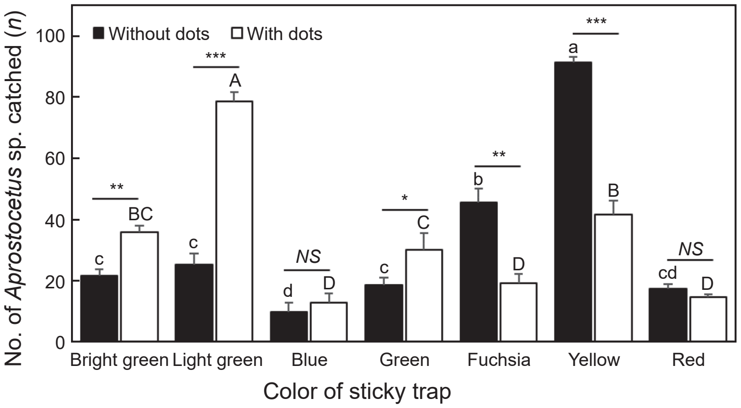

圖 1. 不同顏色黏蟲板對 *Aprostocetus* sp. 之吸引程度。

Fig. 1. Mean number of *Aprostocetus* sp. per trap captured in different colored sticky traps. Different uppercase and lowercase letters show significant differences among dot and without dot treatments, respectively, according to Tukey's HSD test. The asterisk indicates degree of significant differences (*, **, ***: $P < 0.05$, 0.01 and 0.001) in each same color group by *t*-test.

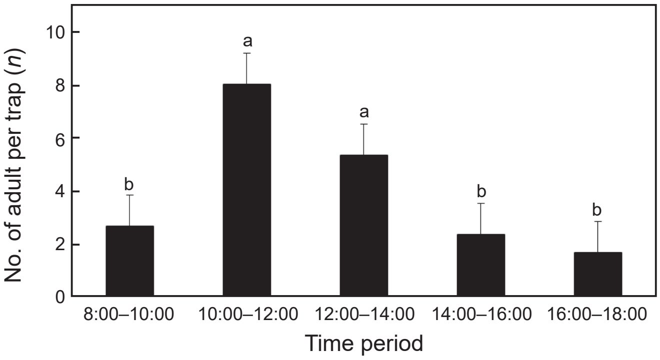

圖 2. 以黃色黏蟲紙調查 *Aprostocetus* sp. 之日律活動。

Fig. 2. Circadian rhythm of *Aprostocetus* sp. by per yellow sticky trap captured in a different time. The different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) by Kruskal-Wallis test.

雌性個體。另由黏蟲板檢視 1,006 隻 *Aprostocetus* sp. 個體，其中 58% 為雄蟲 (585 隻) 個體，42% 為雌蟲 (421 隻) 個體，雌雄比為 0.72，具偏雄現象。

人為施放寄生蜂測試

人為釋放寄生蜂結果顯示，對照組寄生率為 0%，寄生蜂施放組及自然寄生組之寄生率，分別為 24.0% ± 2.8% 及 15.8% ± 1.8%，兩者均符合常態分布檢定 (施放組 $W = 0.8811$, $P > 0.05$；自然寄生組 $W = 1$, $P > 0.05$)，並呈現顯著差異 ($P = 0.01$)。對照組癭蚋的羽化率為 88.9% ± 3.4%，均高於寄生蜂施放組 (67.0% ± 4.4%) 及自然寄生組 (63.3% ± 7.8%) (表 1)。

討論

檬果壯鋏普癭蚋分布於亞洲及非洲地區並造成重大的經濟為害 (Li *et al*. 2003; Cai *et al*. 2013; Shih *et al*. 2013; Zeng *et al*. 2014)，然其天敵之研究稀闕。本研究為少數針對其寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 研究案例，藉由建立寄生蜂的生物學資訊並研擬其他策略共同施行的影響，期在生物防治施行時與其他防治策略相互配合，將整合性管理成效最大化及相互干擾最小化。

黏蟲紙試驗為監測癭蚋害蟲族群或物理防治常見之方法 (Hallett *et al*. 2007; Muhammad *et al*. 2013)，雖然其對寄生天敵的影響研究鮮少，透過本研究可之知 *Aprostocetus* sp. 對於不具黑點的黃色黏蟲板及具黑點的淡綠色黏蟲板，其吸引及干擾效力高於其他顏色黏蟲板組合 (圖 1)。若以最常見及便利取得之黃色黏蟲紙為例，可先於黏蟲紙加上黑點，以減少對於寄生蜂之干擾。此外，具黑點的淡綠色黏蟲板，對於寄生蜂族群的吸引效果，優於其他顏色的黏蟲板，未來倘欲使用此顏色進黏蟲紙行誘集癭蚋害蟲，建議吸引到一定蟲體數量後，即應更新，否則寄生蜂的寄生效力會因受到黏板吸引而降低。未來需進行進一步試驗，方能確知吸引多少蟲體數量後，需進行更換。黏蟲板以具黑點的綠色系 (綠色、淡綠色、翠綠色) 模擬帶有檬果壯鋏普癭蚋之蟲癭葉片，其吸引 *Aprostocetus* sp. 之效力較無黑點的黏蟲板組別高，可能反應寄生蜂會以視覺定位蟲癭 (Yang & Hung 2001)。但除了黃色黏蟲板之外，其它具黑點的黏蟲板 (藍色、桃紅色、紅色) 對於寄生蜂的吸引力均顯著低於具黑點的綠色系黏蟲板，顯示寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 可能不只受蟲癭顏色吸引，也同時受葉片的顏色影響，此更能支持寄生蜂以特定顏色進行蟲癭定位。上述結果顯示，以黏蟲紙作為監測或進行物理防治時，須注意黏蟲紙的顏色及黏蟲紙更換頻度，因為兩者均可能對寄生蜂造成干擾，進而降低其寄生效力。

兩性生殖與孤雌生殖的交替策略，是膜翅目昆蟲在生殖系統獨特的適應發展策略。van der Kooi *et al*. (2017) 指出行孤雌生殖的節肢動物，較非孤雌生殖的近緣物種分布較廣，也具有較多元的生態棲位。此外，Aeschlimann (1990) 亦指出行孤雌生殖之寄生蜂可作良好的害蟲防治資材，不僅可降低作為生物防治資材的限制，亦可迅速大量繁殖，降低防治成本。然而本研究顯示，*Aprostocetus* sp. 具產雄孤雌生殖模式，但是否具產雌孤雌生殖模式，則需進一步測試。除此，Fellowes *et al*. (2007) 指出寄生蜂的雌雄性比例主要受環境及寄主因子影響，以環境因子而言，當環境壓力越小時，繁殖策略以孤雌生殖為主，以增加族群的

表 1. 檬果壯鋏普癭蚋及其寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 之羽化數量及比率。

Table 1. Emergence of *Procontarinia robusta* and its parasitoid *Aprostocetus* sp.

Treatment (n = 3)	Emergent no. of *P. robusta* (%)	Parasitism (%)	Unknown death
Non parasitic	373.3 ± 17.0 (88.9% ± 3.4%)	0 (0% c[z])	47.0 ± 16.5 (10.8% ± 3.4%)
Parasitic group (natural condition)	280.0 ± 16.5 (67.0% ± 4.4%)	66.0 ± 7.0 (15.8% ± 1.8% b)	72.0 ± 26.2 (17.2% ± 6.1%)
Parasitic group (add 5 females)	263.3 ± 15.7 (63.3% ± 7.8%)	101.0 ± 19.7 (24.0% ± 2.8% a)	54.0 ± 24.9 (12.7% ± 5.1%)

[z] The different letters after parasitic ratio show significant differences by *t*-test ($P < 0.05$).

個體數量，提高物種適存度。反之，當環境壓力驟升時，子代的雄性比例會上升，族群內的個體藉由基因交流，增加遺傳變異性以提高於環境的適存度。以寄主因子而言，寄生蜂在面對體型較大的寄主時會產下雌性的子代；反之，則產下雄性的子代 (Charnov *et al*. 1981; Bressac & Chevrier 1998; Paine *et al*. 2004; Wang *et al*. 2008; Aruna & Manjunath 2010)。本研究顯示，*Aprostocetus* sp. 之野外調查雌雄性比為 0.72：1，屬於雄性比例較高的偏雄現象，雖目前還未確認何種因素影響，但未來可於室內進行癭蚋寄主體型大小對於 *Aprostocetus* sp. 之性比試驗。

寄生蜂日律試驗顯示，寄生蜂於 10–14 時的時段被吸引的數量較其他時段多 (圖 2)，可推論其寄生行為於 10–14 時時段較為頻繁。若與化學藥劑防治共同進行防治時，應避免於此時段進行。雖然目前未取得癭蚋成蟲在 1 d 之中羽化高峰之時段資料，但 Yukawa & Rohfrisch (2005) 曾提出大多數癭蚋物種於凌晨或傍晚羽化。配合本研究結果，建議將藥劑施行時機設定在接近癭蚋成蟲羽化，且避開寄生蜂主要活動的時段。如此，不僅可增加癭蚋成蟲與藥劑接觸的觸殺效率，也可降低寄生蜂與藥劑接觸的機會，使兩者防治效益不相互抵消。寄生蜂的生物防治發展，是建立在許多基礎生物學研究資料之上，以確認生物防治之侷限性及防治效力。本研究人為施放寄生蜂試驗顯示，增加寄生蜂個體數可提高總體寄生率 (表 1)，未來可進一步測試寄生蜂施放數量與寄生效益的相關性。

誌謝

本研究以第二及第三作者於 2015 年與 2016 年參加國中科學展覽 (主題分別為「『癭』室了得，硬是了得！探討檬果壯鋏普癭蚋的生態及生物防治可行性」及「捕『蜂』捉『癭』 ~ 探討一種未知寄生蜂的生態及對檬果壯鋏普癭蚋寄生模式」) 之部分資料為基礎，由其他共同作者指導並進行彙整、分析、詮釋及轉寫。研究期間承高雄市立明華國民中學王釋玄、李昂勳、林品汝、倪羽薇、蘇育弘、李冠徵於調查採樣、數據整理之協助。文成後，感謝中興大學邱俊禕及廖一璋於統計分析之協助。

引用文獻

Aeschlimann, J. P. 1990. Simultaneous occurrence of thelytoky and bisexuality in hymenopteran species, and its implications for the biological control of pests. Entomophaga 35:3–5. doi:10.1007/BF02374295

Aruna, A. S. and D. Manjunath. 2010. Reproductive performance of *Nesolynx thymus* (Hymenoptera: Eulophidae) as influenced by host (*Musca domestica*) size. Biocontrol 55:245–252. doi:10.1007/s10526-009-9256-3

Bressac, C. and C. Chevrier. 1998. Offspring and sex ratio are independent of sperm management in *Eupelmus orientalis* females. J. Insect Physiol. 44:351–359. doi:10.1016/S0022-1910(97)00119-4

Cai, H. J., P. Kolesik, H. Y. Wang, F. R. Liao, V. Quintao, K. M. Harris, and G. A. Bellis. 2013. Description of the immature stages and gall morphology, and molecular characterisation of *Procontarinia robusta*, a gall midge (Diptera: Cecidomyiidae) damaging leaves of mango *Mangifera indica* L. (Anarcadiaceae) in southern Asia. Aust. J. Entomol. 52:206–211. doi:10.1111/aen.12027

Charnov, E. L., R. L. Los-den Hartogh, W. T. Jones, and J. van den Assem. 1981. Sex ratio evolution in a variable environment. Nature 289:27–33. doi:10.1038/289027a0

Fellowes, M. D. E., J. J. M. van Alphen, and M. A. Jervis. 2007. Foraging behaviour. p.1–71. *in*: Insect Natural Enemies: A Practical Perspective (Jervis, M. A., ed.) Springer, Dordrecht, The Netherlands. 748 pp.

Hallett, R. H., S. A. Goodfellow, and J. D. Heal. 2007. Monitoring and detection of the swede midge (Diptera: Cecidomyiidae). Can. Entomol. 139:700–712.

Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4:1–9.

Kogan, M. 1998. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. Annu. Rev. Entomol. 43:243–270. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.243

Li, J., W. J. Bu, and Q. Y. Zhang. 2003. A new species of gall midge (Diptera: Cecidomyiidae) attacking mango leaves from China. Acta Zootax. Sin. 28:148–151.

Lin, S. F., P. R. Lin, Y. W. Ni, M. M. Yang, and H. H. Hao. 2018. Gall development, structure, and prefer-

ence position of the invasive cecidomyiid *Procontarinia robusta* Li, Bu & Zhang (Diptera: Cecidomyiidae). Formosan Entomol. 38:84–91. (in Chinese with English abstract) doi:10.6662/TESFE.2018009

Lin, S. F., S. S. Wang, A. S. Lee, M. M. Yang, and H. H. Hao. 2019. Parasitic behavior of a potentially natural enemy, *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), on mango pest cecidomyiid *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae). J. Taiwan Agric. Res. 68:246–253. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201909_68(3).0006

Muhammad, W., N. Iqbal, S. Saeed, M. Javed, and K. M. Khalid. 2013. Monitoring and varietal preference of mango midge, *Procontarinia mangicola* (Diptera: Cecidomyiidae). Pakistan J. Zool. 45:1273–1278.

Paine, T. D., A. L. Joyce, J. G. Millar, and L. M. Hanks. 2004. Effect of variation in host size on sex ratio, size, and survival of *Syngaster lepidus*, a parasitoid of *Eucalyptus* longhorned beetles (Phoracantha spp.): II. Biol. Control 30:374–381. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.01.013

Pedigo, L. P., S. H. Hutchins, and L. G. Higley. 1986. Economic injury levels in theory and practice. Annu. Rev. Entomol. 31:341–368. doi:10.1146/annurev.en.31.010186.002013

Pedigo, L. P. and L. G. Higley. 1996. Introduction to pest management and thresholds, p.3–8. *in*: Economic Thresholds for Integrated Pest Management (Higley, L. G. and L. P. Pedigo, eds.) University of Nebraska Press, Lincoln, NE. 327 pp.

Shih, H. T., H. H. Hao, Y. C. Chiu, F. C. Lin, and M. M. Yang. 2013. A revised and annotated checklist of insects and mites of mangos from Taiwan. Formosan Entomol. 33:27–51. doi:10.6661/TESFE.2013003

van der Kooi, C. J., C. Matthey-Doret, and T. Schwander. 2017. Evolution and comparative ecology of parthenogenesis in haplodiploid arthropods. Evol. Lett. 1:304–316. doi:10.1002/evl3.30

Wang, X. Y., Z. Q. Yang, H. Wu, and J. R. Gould. 2008. Effects of host size on the sex ratio, clutch size, and size of adult *Spathius agrili*, an ectoparasitoid of emerald ash borer. Biol. Control 44:7–12. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.10.011

Yang, E. C. and Y. S. Hung. 2001. Color attraction to insects- The fundamental and application. p.66–77. *in*: Proceedings of the Symposium on the Progress of Taiwan Entomological Research at the Threshold of 21st Century. December 15, 2001. Taichung, Taiwan. National Museum of Natural Science, Taichung. (in Chinese with English abstract)

Yukawa, J. and O. Rohfrisch. 2005. Biology and ecology of gall-inducing cecidomyiidae (Diptera). p.274–304. *in*: Biology, Ecology, and Evolution of Gall-Inducing Arthropods. (Ramna, A., C. W. Schaefer, and T. M. Withers, eds.) Science Publishers, Enfield, NH. 817 pp.

Zeng, C., Y. L. Li, R. R. Xiao, L. X. Huang, Y. D. Robleh, A. A. Bourhan, and Y. Peng. 2014. Preliminary study on *Procontarinia robusta*, one kind of pest of mango tree, in Djibouti. J. Hubei Univ. (Natural Science) 36:303–306. (in Chinese with English abstract)

Parasitic Strategy and Circadian Rhythm of *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), a Natural Enemy of Mango Pest *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae)

Sheng-Feng Lin[1], Yi-Syuan Lee[2], Chia-Lin Liu[2], Man-Miao Yang[3], and Hsiou-Hua Hao[4,*]

Abstract

Lin, S. F., Y. S. Lee, C. L. Liu, M. M. Yang, and H. H. Hao. 2020. Parasitic strategy and circadian rhythm of *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), a natural enemy of mango pest *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae). J. Taiwan Agric. Res. 69(2):147–153.

Biological control is considered as a high specific and low contaminated way to control pests, especially for those preform cryptic symptom or concealed feeding habits, such as borers and gall inducers. In the present study, ovipositional strategy, release experiment, colored sticky-traps and circadian rhythm of parasitic *Aprostocetus* species are studied to evaluate the effectiveness of biocontrol on mango pest cecidomyiid *Procontarinia robusta* Li, Bu & Zhang. Our results show that sex ratio (female/male) of *Aprostocetus* sp. is 0.72, arrhenotoky is one of reproductive mode of *Aprostocetus* sp., and parasitism could be increased via enemy releasing. It indicated that *Aprostocetus* sp. may be considered as a good biocontrol agent. The attractiveness of Aprostocetus sp. on yellow sticky paper was higher than on others. However, the attractiveness of *Aprostocetus* sp. on light green sticky paper was the highest with black spot that mimic the cecidomyiids gall. Results also showed that the attractiveness of *Aprostocetus* sp. was affected not only by color but also by existence of gall. In circadian rhythm survey, attraction number of *Aprostocetus* sp. was not significantly different between time in 10:00–12:00 and 12:00–14:00. Nevertheless, attraction numbers of *Aprostocetus* sp. in these two periods were significantly higher than other three periods, 8:00–10:00, 14:00–16:00 and 16:00–18:00. Based on the results, the major parasitic period of *Aprostocetus* sp. was in 10:00–14:00 every day. Accordingly, it is recommended to avoid spraying pesticide during this period. As such, the conflict between chemical control and biological control could be substantially reduced.

Key words: *Mangifera indica* L., Monitoring, Sticky traps, Natural enemy, Taiwan.

Received: October 4, 2019; Accepted: December 24, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: hao@fthes-tari.gov.tw
[1] Ph. D. Student, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Students, Kaohsiung Municipal Minghua Junior High School, Kaohsiung City, Taiwan, ROC.
[3] Professor, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(2):154–168 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202006_69(2).0005 研究報告

利用多倍體化及雜交親本篩選改進藍紫色蝴蝶蘭育種研究

曹進義 [1] 陳威臣 [1] 吳容儀 [2] 吳姿穎 [3] 夏奇鈮 [4,*]

摘要

曹進義、陳威臣、吳容儀、吳姿穎、夏奇鈮。2020。利用多倍體化及雜交親本篩選改進藍紫色蝴蝶蘭育種研究。台灣農業研究 69(2):154–168。

本研究分析蝴蝶蘭花瓣組織之酸鹼值 (pH)，並據此篩選作為藍紫色蝴蝶蘭育種之雜交親本。此外，並以秋水仙素誘導藍紫色蝴蝶蘭種原之多倍體化，擴大藍紫色蝴蝶蘭種原在育種上之應用。以 0.1 mM 秋水仙素浸漬處理藍紫色蝴蝶蘭原生種 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*、*Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 及藍紫色蝴蝶蘭栽培種 *Phalaenopsis* Siam Treasure 無菌播種發芽後約 6 wk 齡原球體 (protocorm) 8 d，進行多倍體誘導。結果顯示，3 種材料之原球體存活率在 59.2–85.0% 之間，4 倍體誘導率為 27.3–32.9%。比較秋水仙素誘導所得之 4 倍體與 2 倍體植株的園藝性狀，顯示 4 倍體植株之花朵質地較硬實，且 *P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 之 4 倍體花朵具較大花徑，4 倍體 *P.* Siam Treasure 的花徑雖未明顯增大，但其花梗較粗短與 2 倍體有明顯差異。4 倍體之雜交親和性，則需進一步測試。花瓣 pH 檢測結果顯示，藍紫色蝴蝶蘭花瓣組織之平均 pH 值在 5.22–5.42 之間，明顯較其他色系為高。篩選花瓣組織 pH 值 (5.33–5.38) 偏高之品種作為雜交親本與藍紫色蝴蝶蘭進行雜交，後裔中表現藍紫色花之比率約為 0.2–62.0%，較逢機選擇之親本明顯有較高之藍紫色表現比例，具有應用於藍紫色蝴蝶蘭育種改進之潛力。

關鍵詞：藍紫色蝴蝶蘭、矢車菊素、秋水仙素、倍體數、流式細胞儀。

前言

蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 因外型優美、花色變化豐富及觀賞期長等優點，深受國內消費者的喜愛，在國際花卉市場亦極具競爭力，是台灣重要外銷花卉之一。台灣為蝴蝶蘭原生種分布的最北界限，亦為重要蝴蝶蘭種原台灣阿嬤 (*Phalaenopsis aphrodite*) 與姬蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris*) 之原生地 (Christenson 2001)。台灣蝴蝶蘭在種原與產業方面具有優勢，多年來藉由雜交育種與組織培養技術，已培育出各種色系的蝴蝶蘭品種，然而在某些特定色系新品種的育成上仍難以突破。其中，以藍紫色系蝴蝶蘭的育成尤其困難，係蝴蝶蘭育種者與產業都亟欲開發與突破之目標 (Tsao 2013)。為滿足消費者之需求，市面上遂出現藉由人工染色方式生產之藍紫色蝴蝶蘭商品 (Wang 2015)。除此之外，Mii (2014) 利用基因轉殖方式將鴨跖草 (*Commelina communis*) 花朵之藍色基因導入蝴蝶蘭，成功使蝴蝶蘭花朵表現出藍色花色，但至今尚未見到基改蝴蝶蘭的上市。藍紫色蝴蝶蘭目前仍缺乏具有良好園藝性狀 (如無法調控花期、花徑小與花型不佳、花梗直立與過長、花朵壽命短等)，並具可涼溫調控花期特性之優良商業品種，同時亦缺乏後裔可表現藍紫色之種原作為親本來進行育種改進，短時間內仍難育成園藝性狀達到當前商業生產要求之品種。惟因藍紫色蝴蝶蘭的

投稿日期：2019 年 8 月 8 日；接受日期：2020 年 1 月 30 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所花卉研究中心助理研究員。台灣 雲林縣。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

稀有性，育種者遂採用各種方法，如利用藍色大花萬代蘭 (*Vanda* John De Biase)、立梗藍色狐狸尾蘭 (*Rhynchostylis coelestis* fma. *coerulea*) 及蝴蝶蘭進行屬間雜交來獲得藍紫色花之後裔 (Wu *et al*. 2016)。然這些異屬雜交之後裔，因生長習性幼年期較長及園藝性狀等因素考量，亦無法符合商業生產的要求。

在蝴蝶蘭花色中，所謂的藍紫色是指包括藍、紫、靛 (indigo)、紫中帶藍、藍中帶紫及紫藍色 (violet-blue) 等色系之描述 (Tsao 2013; Liang 2017)。在蝴蝶蘭原生種中，如 *Phalaenopsis bellina*、*Phalaenopsis corningiana*、*Phalaenopsis equestris*、*Phalaenopsis javanica*、*Phalaenopsis lowii*、*Phalaenopsis lueddemanniana*、*Phalaenopsis modesta*、*Phalaenopsis pulcherrima*、*Phalaenopsis tetraspis*、*Phalaenopsis violacea*、*Phalaenopsis willsonii* 皆已發現具有藍紫色之突變種，這些突變種通常是由正常的粉紅色及紅色突變為藍紫色。此外，觀察上述原生種在台灣環境條件的開花習性，除 *P. lueddemanniana*、*P. tetraspis*、*Phalaenopsis speciosa* 可於冷涼之冬季抽梗之外，其他原生種皆為夏、秋高溫季節抽梗開花之類型，亦即上述這些原生種大都未具備涼溫催梗之商業生產特性。又觀察目前藍紫色蝴蝶蘭品種 (系) 之雜交譜系，以 *P. pulcherrima* 作為親本者占有極高的比例，這些雜交種的園藝性狀大都有花徑小與花形不佳、花梗直立與過長、單花壽命短、邊開邊凋謝、花朵褪色及葉片肥厚革質等缺點，因此市場接受度低。

根據研究顯示，藍紫色花朵之花色表現主要是受到花色素結構、液胞酸鹼值及金屬離子等因子影響 (Wu 2000; Honda & Saito 2002; Liang 2017)。Griesbach (2005) 指出藍紫色蝴蝶蘭的花色表現是由調控液胞酸鹼值之基因突變所造成，花瓣細胞之酸鹼值由正常顯性紅色之 pH 5.0 突變成為隱性藍紫色之 pH 5.8。Liang (2017) 的研究則推測，諸多因子如液胞中的酸化不足、鋁離子含量較高、鈣離子及鐵離子及這些金屬離子與花青素的莫耳數比等因素，皆可能是造成紫藍花色蝴蝶蘭的原因，與其他花卉之藍色花色單純由於藍色基因 (flavonoid 3’, 5’-hydroxylase; F3’, 5’H) 生合成之飛燕草素 (delphinidin) 的累積所致有所不同。因此，以傳統育種方式將藍紫色原生種與其他色系的商業品種蝴蝶蘭雜交，後裔大都表現出紫紅花色，難以見到藍紫花的出現。顯示與藍紫色蝴蝶蘭雜交之其他色系蝴蝶蘭，必須具備某些特質，方能在與藍紫色蝴蝶蘭雜交後讓其後裔花朵呈現藍紫色，也是本文研究想要探討之課題。

本研究首先分析藍紫色蝴蝶蘭之色素為何種成分，並探討以蝴蝶蘭花瓣組織之酸鹼值篩選親本之可行性。此外，另利用秋水仙素誘導藍紫色蝴蝶蘭種原多倍體化，藉此擴大藍紫色蝴蝶蘭種原之可利用性與改善其雜交親和性。期望藉由上述方法，能提高藍紫色種原之利用性，以及雜交後裔藍紫色花表現比率，同時改善藍紫色花系蝴蝶蘭園藝與開花特性之目的。

材料與方法

藍紫色花朵色素萃取與分析

分別選取花色淺藍紫色花與深藍紫色花之蝴蝶蘭原生種 *P. violacea* fma. coerulea ‘Taiwan’ 及 *P. violacea* fma. *coerulea* ‘Norton USA Indigo’ (圖 1) 完全展開 3 d 之整朵花，進行冷凍乾燥後置入研缽，並添加液態氮研磨成粉末狀。取 0.02 g 粉末加入含有 1% 鹽酸的甲醇進行花青素萃取，萃取至上清液無顏色為止，將萃取液以真空濃縮機 (Thermo SPD111V, Waltham, MA, USA) 濃縮定量至 1 mL。取 0.5 mL 萃取液加入 0.25 mL 2.4 N 鹽酸均勻混合，在 100℃下進行酸化 40 min。酸化後濃縮至 0.5 mL，並以 0.45 μM 過濾膜過濾，以濾液進行高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析花青素之種類及含量。HPLC (Waters 2695, Waters 2996, Milford, MA, USA) 分析條件移動相為水：醋酸：甲醇 = 69 : 10 : 21，流速 1 mL min^{-1}，分析管柱為 octadecylsilica (ODS) column (Inertsil ODS-3 column, 4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm; precolumn: Inertsil ODS-3 column, 4.6 mm × 33.0 mm, 5 μm, GL Sciences, Tokyo, Japan)。

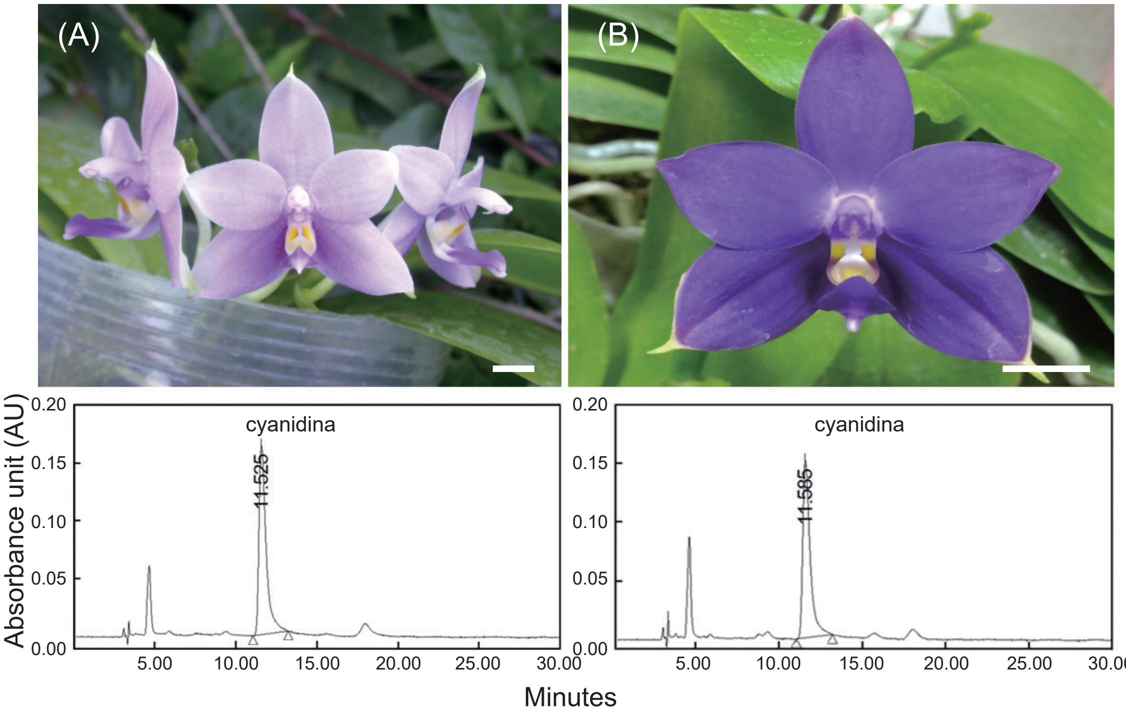

圖 1. 以高效液層分析儀 (HPLC) 分析淺藍紫色與深藍紫色蝴蝶蘭原生種 (A) *Phalaenopsis violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' 及 (B) *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo' 之藍紫色成分。

Fig. 1. Anthocyanin composition of light and dark blue-purple flowers analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), (A) *P. violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' and (B) *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo'. Bars = 1 cm.

以矢車菊素 (cyanidin) 與飛燕草素 (delphinidin) (Extrasynthese, Genay Cedex, France) 之標準品製作檢量線。

無菌播種

取 3 種藍紫色蝴蝶蘭，分別為 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *Phalaenopsis* Siam Treasure 自花授粉 (約 120–180 d) 之果莢進行無菌播種，播種育苗方法參照 Tsao *et al.* (2018)。將種子均勻接種在固體培養基上並置於培養室培養，培養室培養環境為溫度 25℃ ± 1℃，光照強度為 38 µmol m^{-2} s^{-1} 及 14 h 光週期。固體培養基以花寶 1 號 (HYPONeX No. 1. N : P : K = 7 : 6 : 19) 為基本鹽類，添加 1 g L^{-1} Peptone、1% 蔗糖、2 g L^{-1} 活性碳、25 g L^{-1} 香蕉、50 g L^{-1} 馬鈴薯以及 8 g L^{-1} Bacto Agar (Difco, Detroit, MI, USA)。固體培養容器為直徑 90 mm、高度 15 mm 的培養皿，每皿置 25 mL 培養基。

秋水仙素誘導多倍體化

以 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *P.* Siam Treasure 無菌播種 6 wk 後，大小約 1.5 mm 之原球體 (protocorm) 為培植體。經刻傷處理後 (以解剖刀切割原球體邊緣一刀)，置入含有 0.1 mM 秋水仙素之培養液中浸漬處理 8 d。原球體在處理期間於避光環境下，以 50 rpm 轉速進行震盪培養 (Griesbach 1981)；浸漬處理後之原球體以無菌水清洗 3 次，將原球體接種於不含秋水仙素之無菌播種培養基中。其中，培養 *P. equestris* 原球體之培養基未添加活性碳，其餘培養基及處理方法皆參照 Tsao *et al.* (2018)。每一種與栽培種接種 3 皿，每皿接種 30 個原球體，並於接種 4 wk 後調查存活率。

染色體倍體數之流式細胞儀分析

參考 Hsia *et al*. (2010) 的分析方法，切取培植體長出大小約 0.3–0.5 cm^2 幼嫩葉片，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Münster, Germany)，以刀片將葉片組織切碎後過濾，再於濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B。靜置染色 3 min 後，以流式細胞儀 (Partec PA, Münster, Germany) 檢測，每種藍紫色蝴蝶蘭每皿逢機檢測 30 個樣品 (含原球體分裂增生之培植體樣品)。每個培植體樣品同一位葉取樣檢測 2 次確認倍體數，檢測之細胞數為 5,000 個。

根尖染色體染色分析

於中午 11:30–12:30 期間，切取經流式細胞儀檢測為 2 倍體 (對照組) 與多倍體之藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. bellina* fma. *coerulea* 瓶苗之根尖，進行染色體分析。根尖染色體分析方法參照 Tsao *et al*. (2018) 進行。取幼嫩根尖浸於 0.002 M 8–HQ (8-hydroxyquioline) 於黑暗環境下處理 3–4 h，以無菌水清洗 3 次，之後以 Farmar's solution (95% alcohol : acetic acid = 3 : 1) (新鮮配製) 固定液浸泡 24–48 h，接著用無菌水清洗，之後置入 70% 酒精並放置於 4℃冰箱中保存備用。觀察時先以無菌水將樣品清洗數次後，置於酵素溶液中 (6% pectinase 及 6% cellulose 溶於 75 mM KCl，pH 4)，於 37℃下作用 1 h 後，取出以無菌水清洗數次。然後夾取適量經酵素軟化後的根尖置於載玻片上，加入 lacto–propionic–orcein 染劑，輕壓使染色體均勻分布後，夾出不要的組織碎片，蓋上蓋玻片染色數分鐘後，於酒精燈上迅速過火使細胞膨大，以手掌壓片後，於光學顯微鏡下觀察並照相記錄。

花朵及植株性狀調查

將 2 倍體與秋水仙素誘導所得之 4 倍體瓶苗出瓶，栽培於行政院農業委員會農業試驗所生技組配備有水牆風扇之溫室，約 15 mo 後，取同季節 (夏季) 第一次開花之 2 倍體與 4 倍體植株各 5 株，進行花朵及植株性狀調查。

花瓣組織 pH 檢測

收集各種大小花徑及顏色之花，如藍紫、白、粉紅、深紅、黃綠、黑花 (harlequin)、綠花紅斑等花色，共 118 個蝴蝶蘭品種 (系)，並依其花瓣質地區分為蠟質與非蠟質。花瓣組織 pH 檢測參考 Griesbach (2005) 方法並稍作修正。每個蝴蝶蘭品種 (系) 皆以取自 3 個不同著花位置完全展開第一天之花朵為材料，以刀片或鑷子撕或刮取花瓣之上表皮。使用 S40 SevenMulti™ pH 表面酸鹼度檢測儀 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) 搭配 InLab Surface pH 複合液體補充型電極 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)，以電極直接測定花瓣上表皮組織之酸鹼值，並以相同方法檢測雜交後代花瓣上表皮酸鹼值。

利用花瓣 pH 值篩選之他色蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交

依據花瓣組織 pH 檢測之結果，選出呈現 pH 值較高 (pH 5.33–5.38) 之白色或其他花色蝴蝶蘭品種 (系)，並評估其遺傳背景與雜交譜系。據此，篩選出雜交親本，並與藍紫色蝴蝶蘭進行互交，調查雜交後裔花朵之藍紫色表現情形。

統計分析

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗資料先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理間差異顯著，再進行最小顯著差異性測驗 (least significant difference; LSD) 比較各處理平均值間的差異性。其中，培植體存活率與多倍體率之數據先經 $\sin^{-1}$ 角度轉換後，再進行統計分析。各項分析工作利用 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 統計分析套裝軟體進行。

結果

藍紫色蝴蝶蘭花朵之色素成分分析

以淺藍紫色與深藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Taiwan' 及 *P. violacea* fma. *coerulea* 'Norton USA Indigo' 完全展開 3 d 之花朵萃取其花色素，並與矢車菊素與飛

燕草素之標準品進行比對。HPLC 分析結果顯示，上述兩原種藍紫色花之主要色素成分為矢車菊素 (圖 1)，並未檢出由藍色基因 (flavonoid 3', 5'-hydroxylase; F3', 5'H) 所生合成之飛燕草素。

以秋水仙素進行藍紫色蝴蝶蘭多倍體化誘導及倍數性分析

三種藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea*、*P*. Siam Treasure 之原球體以秋水仙素進行多倍體誘導，結果顯示以 *P*. Siam Treasure 之原球體存活率較低，為 59.2%；*P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 之存活率較高，分別為 73.3 和 85.0% (表 1、圖 2)。在多倍體誘導率方面，依據流式細胞儀檢測結果，顯示 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *P*. Siam Treasure 之 4 倍體誘導率，分別為 27.3、31.3 及 32.9% (表 1、圖 3)。將 *P. bellina* fma. *coerulea* 流式細胞儀檢測為 4 倍體之苗株，進行根尖染色體分析，結果證實確為 4 倍體 (圖 4)，兩種檢測方法之結果相符合 (*P. equestris* fma. *coerulea* 與 *P*. Siam Treasure 未進行根尖染色體染色分

表 1. 秋水仙素 0.1 mM 處理藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*、*Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 及 *Phalaenopsis* Siam Treasure 之原球體 8 d 對多倍體誘導之影響。

Table 1. Effects of 0.1 mM colchicine for 8 d exposure on polyploidy induction using protocorms of *P. bellina* fma. *coerulea*, *P. equestris* fma. *coerulea* and *P*. Siam Treasure[z].

Species or variety	Survival rate (%)[y]	Ploidy (%)[x] 2x	4x
P. bellina fma. *coerulea*	73.3 ± 6.9 ab[w]	72.7 ± 5.3 a	27.3 ± 5.1 a
P. equestris fma. *coerulea*	85.0 ± 2.9 a	68.7 ± 7.6 a	31.3 ± 6.5 a
P. Siam Treasure	59.2 ± 6.8 c	67.1 ± 10.4 a	32.9 ± 9.1 a

[z] Colchicine treatment and medium were same as Tsao *et al*. (2018). *P. equestris* fma. *coerulea* was cultured on the same medium but without charcoal. Each species and variety had 3 replications and each replication contained 30 protocorm explants.
[y] Percentage of survival rate = (no. of green and protocorms/30) × 100%.
[x] Percentage of ploidy = (no. of ploidy explants/30 samples were detected) × 100%.
[w] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

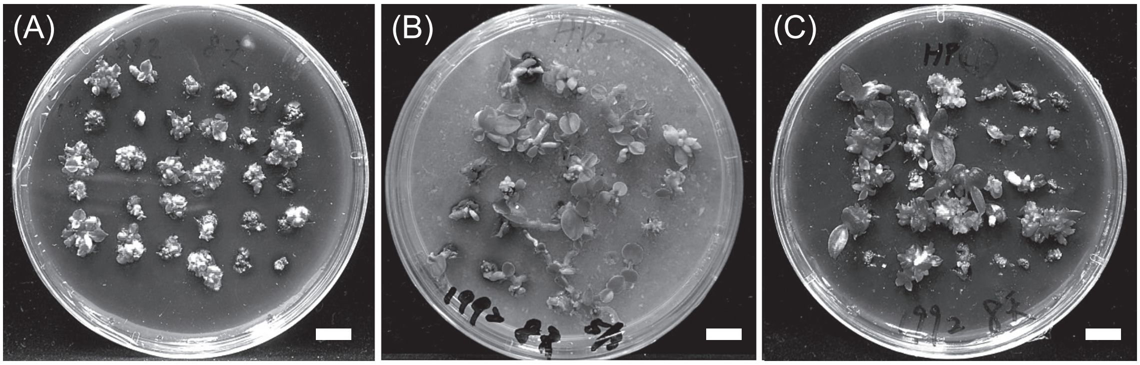

圖 2. 以 0.1 mM 秋水仙素處理藍紫色蝴蝶蘭 (A) *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*；(B) *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea*；及 (C) *Phalaenopsis* Siam Treasure 原球體 8 d 並經 8 wk 培養後之生長情形。培養基配方參照 Tsao *et al*. (2018)，其中 *P. equestris* fma. *coerulea* 接種之培養基不含活性碳。

Fig. 2. Growth of protocorms of (A) *P. bellina* fma. *coerulea*; (B) *P. equestris* fma. *coerulea*; and (C) *P*. Siam Treasure after exposure with 0.1 mM colchicine for 8 d in a liquid medium followed by 8 wk culture. Culture medium was the same as Tsao *et al*. (2018), but *P. equestris* fma. *coerulea* was cultured in the same medium without charcoal. Bars = 1 cm.

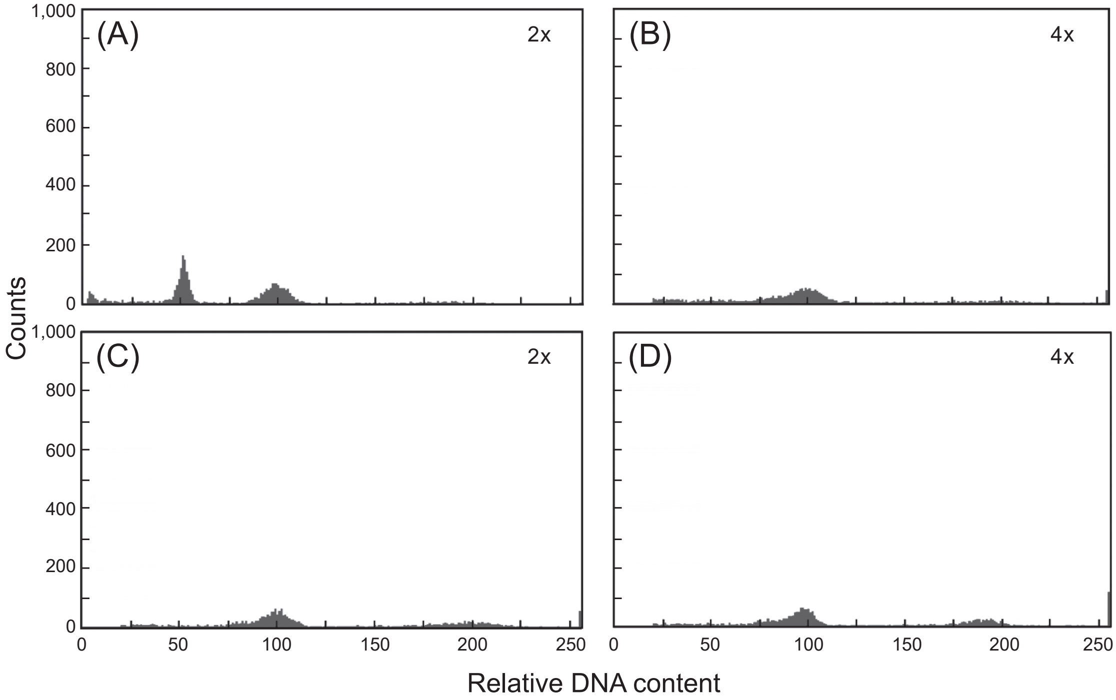

圖 3. 利用流式細胞儀分析藍紫色蝴蝶蘭 (A) *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea* 2x；(B) *P. bellina* fma. *coerulea* 4x；(C) *Phalaenopsis* Siam Treasure 4x；及 (D) *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 4x 之圖譜。

Fig. 3. Flow cytometric histograms of various ploidies of (A) *P. bellina* fma. *coerulea* 2x; (B) *P. bellina* fma. *coerulea* 4x; (C) *P.* Siam Treasure 4x; and (D) *P. equestris* fma. *coerulea* 4x plantlets.

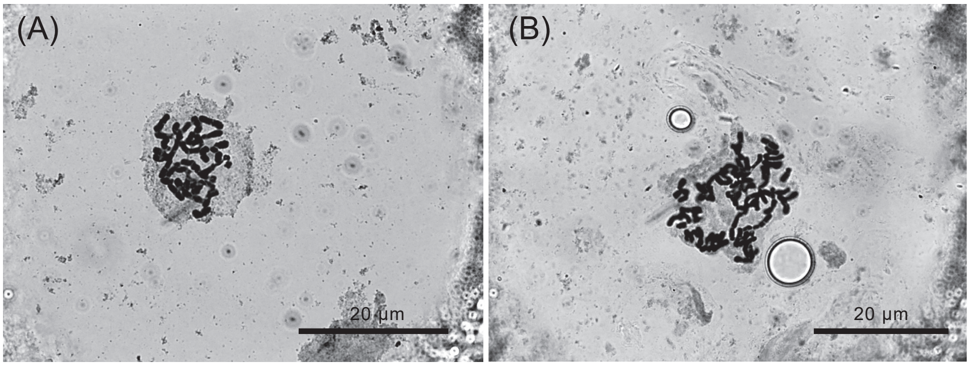

圖 4. 藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea* 之 2 倍體與 4 倍體之瓶苗根尖染色體染色分析，(A) 2n = 2x = 38 及 (B) 2n = 4x = 76。

Fig. 4. Squash staining of chromosome using in vitro root tips of *P. bellina* fma. *coerulea*, (A) 2n = 2x = 38 and (B) 2n = 4x = 76.

析)。比較 4 倍體植株與對照組 (2 倍體) 植株之花朵及園藝性狀，4 倍體花朵質地較堅挺硬實。其中，*P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 具有較大的花徑，另 4 倍體之 *P. bellina* fma. *coerulea* 葉片、小花柄、唇瓣中央裂片、蕊柱較寬，小花柄、蕊柱較長；

4 倍體之 *P. equestris* fma. *coerulea* 唇瓣中央裂片、蕊柱較寬且唇瓣中央裂片較長；而 4 倍體之 *P*. Siam Treasure 花徑雖未明顯增大，但其花梗較短且直徑較粗、葉片短，植株型態與 2 倍體植株間呈現明顯差異 (表 2、圖 5)。

不同花色蝴蝶蘭花瓣組織之酸鹼值檢測

取各種大小花徑及不同顏色 (如藍紫、白、粉紅、深紅、黃綠、黑花、綠花紅斑等) 花色總共 118 個蝴蝶蘭品種 (系)，檢測其花瓣上表皮組織之 pH 值。結果顯示，非蠟質類之藍紫色花瓣平均 pH 值為 5.22–5.27，最高可測得 pH 5.48，雖與白、深紅花瓣間之 pH 無顯著差異，但其平均仍較其他顏色花之 pH 值為高。在蠟質性花瓣類之 pH 值檢測，以藍紫色 pH 值最高，平均為 5.42，最高可測得 pH 5.54。深紅、黃綠、綠花紅斑等花色之平均 pH 值亦較高，在 5.33–5.38 之間，最高可測得 pH 5.52，顯著高於白、粉紅及黑花之4.96–5.22 (表 3)。

以花朵 pH 值較高之他色蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交

依據花瓣組織 pH 檢測結果，挑選呈白色及其他花色花朵 pH 值較高之蝴蝶蘭品種，再根據其遺傳背景與譜系加以評估後，從中挑選出適當之親本與藍紫色蝴蝶蘭互為父母本，共進行 63 個雜交組合。其中，編號 CYT115、CYT142、CYT155 及 CYT191 之 4 個雜交組合成功獲得後代。觀察 4 個組合雜交後裔之花色表現，除了 CYT155 之雜交後裔花色皆為紅色之外，其餘 3 組合 CYT115、CYT142 及 CYT191 之雜交後裔花朵皆有藍紫色表現，其表現比率 (藍紫色花株數/後裔總株數) 分別為 0.2、61.7 及 9.8% (表 4)。其中，CYT115 之藍紫色表現在蕊柱基部周圍，花徑約 8.5 cm，可涼溫催梗；CYT142 選拔出具有圓整花型與花序排列佳之藍紫色優良單株，花徑約 4.5 cm，花期在秋季；CYT191 選拔出有雙梗特性，古銅色花瓣以及藍紫色唇瓣，並具有濃郁香氣之優良單株，花徑約 5 cm，花期在夏季 (圖 6)。

表 2. 2 倍體藍紫色蝴蝶蘭 *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*、*Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* 及 *Phalaenopsis* Siam Treasure 與其誘導所得之 4 倍體植株之園藝性狀比較。

Table 2. Comparison of horticultural traits between diploid and tetraploid plants of *P. bellina* fma. *coerulea*, *P. equestris* fma. *coerulea* and *P*. Siam Treasure[z].

Ploidy of species	Stalk length (cm)	Stalk diameter (mm)	Flower diameter (cm)	Column length (cm)	Column width (mm)	Pedicel length (cm)	Pedicel width (mm)	Apical lobe length (cm)	Apical lobe width (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)
P. bellina fma. *coerulea*											
2x	4.9 b[y]	3.7 a	3.9 b	1.1 b	4.1 b	3.3 b	2.5 b	1.3 a	8.0 b	9.0 a	5.1 b
4x	4.3 a	4.8 a	4.8 a	1.3 a	4.6 a	4.0 a	3.4 a	1.5 a	9.8 a	8.8 a	6.3 a
P. equestris fma. *coerulea*											
2x	16.0 a	2.0 a	2.0 b	0.8 a	1.9 a	2.3 a	1.4 a	0.9 b	7.0 b	10.5 a	4.1 a
4x	19.4 a	2.7 a	2.5 a	0.8 a	1.9 a	2.7 a	1.8 a	1.1 a	7.3 a	10.7 a	4.4 a
P. SiamTreasure											
2x	33.7 a	2.5 b	3.9 a	-[x]	-	-	-	-	-	12.2 a	4.0 a
4x	19.6 b	3.2 a	3.9 a	-	-	-	-	-	-	8.6 b	3.6 a

[z] Diploid (2x) and tetraploid (4x) plants were cultivated on pad in a fan green house for 60 wk, and 5 plants from each which blooming at the first time in the same season were used for horticultural traits investigation. Stalk length did not include inflorescence length, stalk diameter was measured in the second section of stalk, and leaf length and width of the largest leaf were measured. Each horticultural traits investigation had 3 replications with 5 plants per replication.

[y] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

[x] No measurement on pedicel length, pedicel width, apical lobe length, apical lobe width, column length and column width of *P*. Siam Treasure.

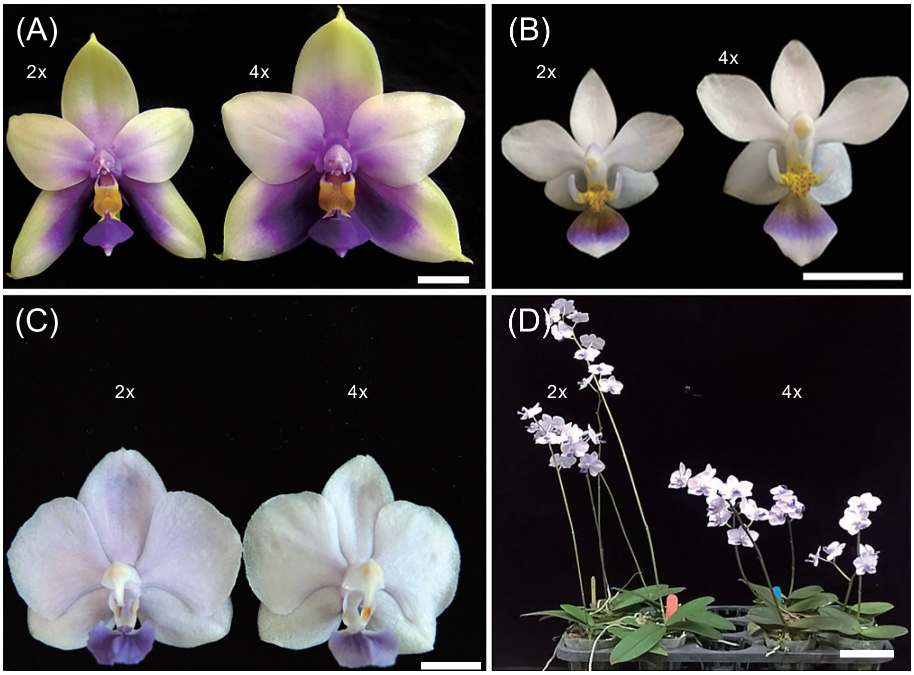

圖 5. 藍紫色蝴蝶蘭 (A) *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*；(B) *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea*；(C) *Phalaenopsis* Siam Treasure 之 2 倍體與 4 倍體花朵；及 (D) *P*. Siam Treasure 植株形態比較。

Fig. 5. Diploid and tetraploid flowers of (A) *P. bellina* fma. *coerulea*; (B) *P. equestris* fma. *coerulea*; (C) *P*. Siam Treasure; and (D) *P*. Siam Treasure plants. (A–C), bars = 1 cm. (D), bar = 8 cm.

表 3. 不同花色與花瓣質地蝴蝶蘭之花瓣上表皮組織 pH 值。

Table 3. pH value of upper epidermis tissue of petal from various color and petal texture of *Phalaenopsis* varieties[z].

	Average value of pH	
Color	Waxy	Non-waxy
Blue-purple	5.42 ± 0.11 a[y]	5.22 ± 0.13 ab
Light blue-purple	5.41 ± 0.13 ab	5.27 ± 0.21 a
Yellow green	5.38 ± 0.14 ab	5.01 ± 0.15 c
Dark red	5.33 ± 0.08 abc	5.12 ± 0.09 abc
Green with red spot	5.33 ± 0.04 abc	-[x]
Pink	5.22 ± 0.06 bc	5.07 ± 0.07 bc
White	5.18 ± 0.18 c	5.13 ± 0.16 abc
Harlequin	4.96 ± 0.16 d	-

[z] A total of 118 samples of *Phalaenopsis* varieties were detected. Samples were fully opening flower in first day taken from 3 different positions in the same stalk as samples to detect. Each detection had 3 replications.
[y] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
[x] No samples were detected.

討論

根據 Katsumoto *et al*. (2007) 研究顯示，花青素之藍紫色除了由藍色基因 (F3', 5'H) 調控所生合成之飛燕草素之外，花色呈現之影響因子尚有花色素結構 (Honda & Saito 2002; Shiono *et al*. 2005; Saito *et al*. 2011; Saito *et al*. 2012)、液胞酸鹼值 (Reuveni *et al*. 2001;

表 4.　選拔之他色蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交其後裔藍紫色花表現比率。

Table 4.　Percentage of blue-purple descendants from four hybridizations by crossing blue-purple varieties with selection of other colors of *Phalaenopsis* varieties as parents[z].

Hybridization code	No. of seedlings	No. of seedlings with blue-purple flower	% of blue-purple seedling
CYT115	1,105	2	0.2
CYT155	95	0	0.0
CYT142	243	150	61.7
CYT191	51	5	9.8

[z] *Phalaenopsis* varieties were selected as parents based on its pH value of upper epidermis tissue from petal (5.33–5.38) to cross blue-purple *Phalaenopsis* varieties. Four success hybridizations were obtained from all 63 crossings.

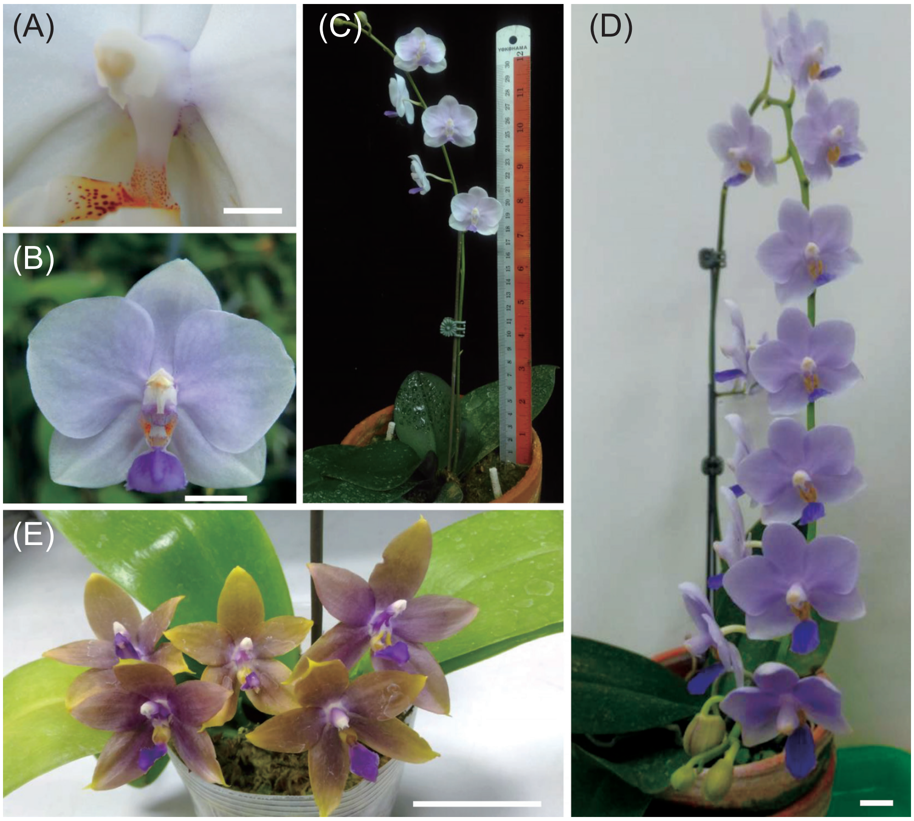

圖 6.　依據花瓣 pH 值篩選之親本與藍紫色蝴蝶蘭雜交其後裔之藍紫色花表現。(A) CYT115 選拔單株，花徑約 8.5 cm，於蕊柱基部表現藍紫色；(B–D) CYT142 選拔之不同單株，具有花形圓整與花序排列優良園藝性狀；(E) CYT191 選拔單株，具雙梗特性及濃郁香氣，花瓣古銅色並具藍紫色唇瓣之優良單株，花徑約 5 cm。

Fig. 6.　Descendants of three hybridizations which using varieties of higher pH values of petal as parents to cross blue-purple varieties. (A) Seedling of CYT115 cross, flower diameter is about 8.5 cm with blue-purple color on the base of column, bar = 5 mm; (B–D) Seedlings of CYT142 cross, which with round flower and flowers arranged orderly in the inflorescence, bars = 1 cm; (E) Seedling of CYT191 cross, which with strong fragrance and double stalks. Flowers with unique cupper color in the petals and blue-purple color in the lip, flower diameter is about 5 cm, bar = 4 cm.

Honda & Saito 2002; Yoshida *et al*. 2003; Griesbach 2005)、金屬離子 (Mg^{2+}、Ca^{2+}、Fe^{3+}、Al^{3+}) (Takeda 2006; Yoshida *et al*. 2006; Schreiber *et al*. 2010; Oyama *et al*. 2015; Liang 2017) 及金屬離子，與共色物如黃酮醇 (flavonals) 與黃酮 (flavones) 的共色作用，形成堆積的複合物 (Wu 2000; Shiono *et al*. 2005; Shoji *et al*. 2007) 等。蝴蝶蘭之藍色基因已被選殖出來，卻是來自紅色之蝴蝶蘭雜交品種 (‘Super Firebird’)，顯示蝴蝶蘭藍紫色表現是受到其他因子所影響，且將此蝴蝶蘭之藍色基因轉殖到矮牽牛以及百合，並未能表現出藍色之花色 (Qi *et al*. 2013)。本研究以 HPLC 分析淺藍紫色與深藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. violacea* fma. *coerulea* ‘Taiwan’ 與 *P. violacea* fma. *coerulea* ‘Norton USA Indigo’ (圖 1)， 而 Liang (2017) 以 HPLC 分別分析紫色及紫羅蘭-藍花色之蝴蝶蘭，結果皆為以矢車菊素為基底的花青素，並未檢測出由藍色基因調控生合成之飛燕草素。根據主要色素之生合成路徑顯示，矢車菊素為經由紅色素之生合成路徑所形成 (Katsumoto *et al*. 2007)，證實蝴蝶蘭之藍紫色花色表現因受到其他因子影響而呈現出藍紫色，並非由藍色基因調控合成飛燕草素而來。

考察目前藍紫色蝴蝶蘭種原大多為 2 倍體之原生種或是一代雜交種，其花朵有壽命短、花朵質地薄、花形差、花徑小、花梗太長、軟等不良園藝性狀。考量目前蝴蝶蘭商業品種大多為 4 倍體，二者在雜交上可能會面臨親和性的問題，即使有後代產生也可能為 3 倍體，不利後續育種工作之進行 (Chen *et al*. 2009)。蝴蝶蘭可利用秋水仙素化學藥劑 (Griesbach 1981, 1985; Azmi *et al*. 2016) 或物理切割原球體 (Chen *et al*. 2009) 等方式進行多倍體化誘導，產生之 4 倍體具有改善雜交不親和性、增大花徑、改善花朵質地與花形等優點 (Griesbach 1981, 1985)，但多倍體化研究鮮少針對藍紫色之蝴蝶蘭。藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 及栽培種 *P*. Siam Treasure 之原球體培植體，其多倍體誘導之存活率與花朵園藝性狀表現出差異性。在存活率方面，*P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 較接近 (73.3–85.0%)，而 *P*. Siam Treasure 則偏低 (59.2%)。顯示不同材料間秋水仙素處理的耐受性並不相同，且原種之存活率較栽培種為高 (表 1、圖 2)。

根據研究顯示，秋水仙素濃度與處理天數，是影響培植體存活率與多倍體誘導效率的重要因子 (Hsia *et al*. 2009, 2010; Azmi *et al*. 2016)，以 *P*. Siam Treasure 來說，需進一步調整秋水仙素處理之條件。而在多倍體誘導率方面，根據流式細胞儀檢測結果，三種材料的差異不顯著，誘導率在 27.3–32.9% 之間，且所誘導之多倍體皆為 4 倍體，並無其他倍數體產生 (圖 3)。更進一步取 4 倍體 *P. bellina* fma. *coerulea* 瓶苗之根尖進行染色體分析 (圖 4)，同樣證實其染色體數目為 4 倍體，與流式細胞儀檢測之結果相符。Tsao *et al*. (2018) 以 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 進行多倍體誘導，亦顯示流式細胞儀檢測倍體數之結果與根尖染色分析一致，但流式細胞儀更簡單快速，有助育種大量篩選工作之進行。

根據前人研究顯示，4 倍體蝴蝶蘭之花徑較 2 倍體為大，且可改善蝴蝶蘭花朵之花形與花瓣質地 (Griesbach 1981, 1985; Chen *et al*. 2009)，但本試驗調查參試之 3 種藍紫色蝴蝶蘭 (兩原種與一栽培種) 4 倍體花朵性狀之表現，發現並非三種材料之 4 倍體皆表現出較大花徑之特性。其中，2 原種 *P. bellina* fma. *coerulea* 與 *P. equestris* fma. *coerulea* 之 4 倍體有較大花徑，顯示出物種間的表現存有差異性。此外，個別 4 倍體植株亦存有差異性，因此建議應建立足夠數量之多倍體族群，較有利於選拔優良 4 倍體單株。3 種材料之 4 倍體花瓣質地皆較 2 倍體硬實，此點與前述學者研究之結果相符。在花器組織上，*P. bellina* fma. *coerulea* 4 倍體之唇瓣中央裂片、蕊柱、小花柄以及 *P. equestris* fma. *coerulea* 之唇瓣中央裂片皆較其 2 倍體較長或寬；在葉片外型上，*P. bellina* fma. *coerulea* 4 倍體葉片較 2 倍體為寬。此外，*P*. Siam Treasure 4 倍體之花梗較粗短，葉片

較短 (表 2、圖 5)，改善了 2 倍體花梗細長、軟及葉片長等缺點。根據石斛蘭 (*Dendrobium*) 的研究顯示，4 倍體植株之花朵壽命可較 2 倍體長 (de Medeiros Vichiato *et al*. 2014)，但亦有指出 4 倍體與 2 倍體花朵壽命相同者 (de Faria *et al*. 2009)。而觀察本研究所誘導 3 種藍紫色蝴蝶蘭少數已開花之 4 倍體，花朵壽命則發現同時存在與 2 倍體花朵壽命長、相同以及較短之情形 (資料未顯示)。前人研究指出，多倍體化可改善雜交不親和性 (Griesbach 1985; Adaniya & Shirai 2001)，但本研究自藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 以及 *P*. Siam Treasure 所誘導之 4 倍體，目前尚未能成功獲得自交或雜交果莢及後裔。因此，此一論點需再進行更多之雜交測試以確認 4 倍體之雜交親和性。

依據英國皇家園藝學會 (The Royal Horticultural Society; RHS) 蝴蝶蘭品種登錄資料顯示，早在西元 1963 年即有藍紫色蝴蝶蘭品種 *Phalaenopsis* Kenneth Schubert 之育種紀錄，是以 *P. pulcherrima* fma. *coerulea* 與 *P. violacea* fma. *coerulea* 二者雜交而來，距今已超過 55 年的時間中，卻鮮有符合商業生產要求亦即具備可涼溫催梗特性之藍紫色蝴蝶蘭新品種的出現。顯示育成具備商品化特性之藍紫色蝴蝶蘭，仍有極大的挑戰性與困難度。歸納傳統藍紫色蝴蝶蘭育種所遭遇到的瓶頸，主要可歸納出藍紫色蝴蝶蘭種原的限制、種間與屬間雜交親和性不佳及後裔難以呈現藍紫色等因素 (Tsao 2013)。觀察藍紫色蝴蝶蘭原生種 *P. bellina*、*P. corningiana*、*P. equestris*、*P. javanica*、*P. lowii*、*P. lueddemanniana*、*P. modesta*、*P. pulcherrima*、*P. speciosa*、*P. tetraspis*、*P. violacea*、*P. willsonii* 及其雜交後裔，共同之特性為園藝性狀不佳，且除了 *P. lueddemanniana*、*P. speciosa* 及 *P. tetraspis* 之外，其他原生種之花期皆在為夏季或近秋季，並不具備涼溫催梗之特性。要改善此缺點，必須與商業化的蝴蝶蘭品種進行雜交育種，同時改良其園藝性狀與開花習性。然而，除了藍紫色蝴蝶蘭種原開花性狀限制之外，觀察其他育種者以及作者自身實際進行藍紫色蝴蝶蘭與商業品種蝴蝶蘭雜交育種之結果發現，這些雜交後裔花色多為紅色。因此，如何使雜交後裔花朵表現出藍紫色，推測商業品種蝴蝶蘭親本之選擇為主要影響因素。

Griesbach (2005) 檢測由紅色蝴蝶蘭原生種 *P. pulcherrima* 而來之藍紫色突變種花瓣組織之 pH 值，結果顯示藍紫色花之 pH 值 (5.8) 較紅色花之 pH 值 (5.0) 為高。藉由二者雜交後裔再行互交或回交，可使花瓣 pH 值較高之後裔族群比例提高，進而提升其藍紫色花後裔之比例，並認為是調控液胞 pH 值之 *ph* 基因突變，使得由原本正常表現顯性之紅色 (pH 值較低) 突變為隱性之藍紫色 (pH 值較高)，且推論此為影響蝴蝶蘭藍紫色表現之主要因子之一。Liang (2017) 分析紫藍與紫色蝴蝶蘭花瓣之酸鹼值，結果顯示紫藍色花瓣具有較高的酸鹼值 (pH 5.33–5.54)，紫色蝴蝶蘭花瓣之酸鹼值較低 (pH 4.77–5.04)。除此之外，該研究亦量測紫藍色與紫色蝴蝶蘭花瓣中五種金屬離子 (鋁、鎂、鈣、鐵、鋅) 的濃度及上述金屬離子與花青素的莫耳數比，結果顯示紫藍色花瓣中的鋁、鈣及鐵離子含量與花青素含量的莫耳數比分別為紫色蝴蝶蘭的 3.6、2.5 及 3 倍，但鎂及鋅離子含量與花青素的莫耳數比則無明顯差異。據此，認為液胞之酸鹼值偏高及含有較高的鋁、鈣及鐵離子與花青素的莫耳數比，可能是蝴蝶蘭表現出紫藍色花的主因，而非僅依飛燕草素累積所致。本研究中檢測各種大小花徑以及蠟質與非蠟質花瓣質地之藍紫、白、粉紅、深紅、黃綠、黑花、綠花紅斑等花色共 118 個蝴蝶蘭品種 (系) 花瓣上表皮組織之 pH 值，結果顯示大部分非蠟質類之非藍紫色蝴蝶蘭花瓣呈較酸性，實際測得之 pH 值為 4.86–5.29 左右，因少數樣品檢測出之 pH 值偏高而造成藍紫色花與白、深紅色蝴蝶蘭花瓣間之平均 pH 值無顯著差異。但相較之下，藍紫色蝴蝶蘭花瓣仍較其他色花瓣之 pH 值為高，平均在 5.22–5.27 之間 (表 3)，最高可測得 pH 5.48。此結果與 Griesbach (2005) 及 Liang (2017) 之研究結果相似。同樣的，蠟質花瓣類之非藍紫色蝴蝶蘭亦有相同情形，花瓣 pH 值較高的樣品包括深紅、黃綠、綠花紅斑等花

色，平均 pH 值在 5.33–5.38 之間，樣品最高可測得 pH 5.52，與藍紫色無顯著差異。而白、粉紅及黑花平均 pH 值則偏在 4.96–5.22 之間，與藍紫色之平均 pH 5.42 具顯著差異 (表 3)。由於大部分育種者與蝴蝶蘭業者皆選擇性狀優良之其他顏色商業品種蝴蝶蘭作為親本與藍紫色蝴蝶蘭雜交，但其後裔花色表現幾乎皆為紅色，並未能育成具有藍紫花色表現之蝴蝶蘭品種 (系)。由於目前尚未見利用花瓣 pH 值較高之其他顏色蝴蝶蘭作為親本選擇標準實際應用於藍紫色蝴蝶蘭之雜交育種，本研究將花瓣 pH 值較高 (5.22 以上) 之其他顏色蠟質與非蠟質蝴蝶蘭選出作為親本與藍紫色蝴蝶蘭雜交，並觀察其雜交後裔之花色表現。結果顯示，共進行 63 個雜交組合中僅 CYT115、CYT142、CYT155 及 CYT191 4 個雜交組合可成功獲得後裔並栽培至開花，各組合實生後裔數量在 51–1,105 株之間。除了 CYT155 雜交組合後裔之花色皆為紅色之外，CYT115、CYT142 及 CYT191 雜交組合後裔皆有藍紫色表現，其比率為 0.2–61.7% (表 4、圖 6)。顯示出以花瓣 pH 值篩選親本，有助於後裔藍紫色花之表現。大多數藍紫色蝴蝶蘭親本皆在夏季抽梗開花，但上述 3 個雜交組合中在 CYT115 選到優良單株具備有涼溫催梗之特性，顯示出大部分藍紫色蝴蝶蘭之第一代雜交種仍難以導入可涼溫催梗之特性。雖然如此，與原始藍紫色蝴蝶蘭親本之開花期仍有差異，例如 CYT142 之抽梗時間為秋季而非原種之夏季。

Griesbach (2005) 指出利用回交可提高藍紫色與紅色蝴蝶蘭原生種 *P. pulcherrima* 雜交後裔 *ph* 隱性基因表現的比例與強度，使花瓣組織 pH 較高，進而使雜交後裔藍紫色花表現比例提高。觀察目前其他育種者及本文第一作者利用遺傳背景較簡單之原生種或珍奇類蝴蝶蘭品種 (系) 與藍紫色蝴蝶蘭進行雜交育種，第一代後裔之花色大多為紅色，其花瓣組織 pH 經檢測有提高之情形 (如表 3 蠟質類深紅色花瓣樣品所示)。pH 平均為 5.33，最高可測得 pH 5.41。再以此為育種材料與藍紫色蝴蝶蘭親本進行回交，確實可使後裔之藍紫色花表現提高。然而，本研究更進一步利用遺傳背景較複雜之大輪 (約 12 cm) 及中輪花徑 (約 8 cm) 商業品種蝴蝶蘭與藍紫色蝴蝶蘭雜交與回交育種至第二代，目前雜交後裔中尚未見藍紫色花之表現，但卻有花徑變小，花期亦重回到夏季，及園藝性狀變差之現象。因此，推論以一般 2 倍體的藍紫色蝴蝶蘭親本欲利用回交育種的方式，使雜交後裔表現藍紫色花僅適合遺傳背景較為簡單之原生種或品種 (系)，對於遺傳背景較複雜之多倍體商業蝴蝶蘭品種並不適用。

目前所誘導之 4 倍體藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina* fma. *coerulea*、*P. equestris* fma. *coerulea* 及 *P.* Siam Treasure 雖然尚未能獲得自交或雜交果莢及後裔，但已建立可應用之 4 倍體藍紫色蝴蝶蘭種原，應可擴大藍紫色蝴蝶蘭育種親本的利用性。本研究已檢測相當數量蝴蝶蘭品種之花瓣表皮組織 pH 值，並據此篩選出花瓣 pH 值較高之品種 (系) 與藍紫色蝴蝶蘭雜交，證實其雜交後裔可成功表現藍紫花色，並已成功獲得特殊花色、香氣、良好花序排列以及花形圓整等優良性狀單株，此一親本篩選模式應可作為今後藍紫色蝴蝶蘭育種改進之參考。

誌謝

本研究承農業試驗所花卉研究中心蔡嫺婷博士協助論文審閱與校正、台南區農業改良場徐淑菁前助理研究員、張淯茱前助理研究員協助指導根尖染色體染色分析技術，以及李芸嫣前計畫助理協助執行染色體分析工作、古坑花卉研究中心楊彩綺小姐協助蝴蝶蘭苗株栽培管理，特此致謝。

引用文獻

Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Sci. Hort. 88:277–287. doi:10.1016/S0304-4238(00)00212-0

Azmi, T. K. K., D. Sukma, S. A. Aziz, and M. Syukur. 2016. Polyploidy induction of moth orchid [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume] by colchicine treatment on pollinated flowers. J. Agric. Sci. 11:62–73. doi:10.4038/jas.v11i2.8118

Chen, W. H., C. Y. Tang, and Y. L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 98:229–238. doi:10.1007/s11240-009-9557-3

Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*: A Monograph. Timber Press. Portland, OR. 330 pp.

de Faria, R. T., L. S. A. Takahashi, and A. B. Lone. 2009. UEL 6: Nova cultivar de *Dendrobium*. Hortic. Bras. 27:114–115. doi:10.1590/S0102-05362009000100023

de Medeiros Vichiato, M. R., M. Vichiato, M. Pasqual, F. A. Rodrigues, and D. M. de Castro. 2014. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Crop Breed. Appl. Biotechnol. 14:154–159. doi:10.1590/1984-70332014v14n3a23

Griesbach, R. J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1:103–107. doi:10.1007/BF02318909

Griesbach, R. J. 1985. Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. J. Hered. 76:74–75.

Griesbach, R. J. 2005. A scientific approach to breeding blue orchids: Exploring new frontiers in search of elusive flower colors. Orchids 74:376–379.

Honda, T. and N. Saito. 2002. Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigments. Heterocycles 56:633–692. doi:10.3987/REV-01-SR(K)2

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2009.05804.06

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2010. *In vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 59:165–176. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2010.05903.03

Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T. A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G. Q. Tao, N. S. Nehra, C. Y. Lu, B. K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J. G. Mason, and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiol. 48:1589–1600. doi:10.1093/pcp/pcm131

Liang, C. Y. 2017. Assessment of violet-blue color formation in *Phalaenopsis* orchids. Master Thesis, Department of Life Sciences, National Cheng Kung University. Tainan, Taiwan. 57 pp. (in English with Chinese abstract)

Mii, M. 2014. Genetic transformation of orchids and production of transgenic blue *Phalaenopsis*. p.73–92. *in*: Taiwan International Orchids Symposium. March 8, 2014. Tainan, Taiwan. Taiwan Orchid Growers Assoc. Pub., Tainan. (in Chinese with English abstract)

Oyama, K., T. Yamada, D. Ito, T. Kondo, and K. Yoshida. 2015. Metal complex pigment involved in the blue sepal color development of hydrangea. J. Agric. Food Chem. 63:7630–7635. doi:10.1021/acs.jafc.5b02368

Qi, Y., Q. Lou, Y. Quan, Y. Liu, and Y. Wang. 2013. Flower-specific expression of the *Phalaenopsis* flavonoid 3',5'-hydoxylase modifies flower color pigmentation in *Petunia* and *Lilium*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 115:263–273. doi:10.1007/s11240-013-0359-2

Reuveni, M., D. Evenor, B. Artzi, A. v. i. Perl, and Y. Erner. 2001. Decrease in vacuolar pH during petunia flower opening is reflected in the activity of tonoplast H^+-ATPase. J. Plant Physiol. 158:991–998. doi:10.1078/0176-1617-00302

Saito, N., F. Tatsuzawa, K. Toki, K. Shinoda, A. Shigihara, and T. Honda. 2011. The blue anthocyanin pigments from the blue flowers of *Heliophila coronopifolia* L. (Brassicaceae). Phytochemistry 72:2219–2229. doi:10.1016/j.phytochem.2011.07.020

Saito, N., M. Nakamura, K. Shinoda, N. Murata, T. Kanazawa, K. Kato, K. Toki, H. Kasai, T. Honda, and F. Tatsuzawa. 2012. Covalent anthocyanin-flavonol complexes from the violet-blue flowers of *Allium* 'Blue Perfume'. Phytochemistry 80:99–108. doi:10.1016/j.phytochem.2012.04.011

Schreiber, H. D., A. M. Swink, and T. D. Godsey. 2010. The chemical mechanism for Al^{3+} complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. J. Inorg. Biochem. 104:732–739. doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.03.006

Shiono, M., N. Matsugaki, and K. Takeda. 2005. Phytochemistry: Structure of the blue cornflower pigment. Nature 436:791. doi:10.1038/436791a

Shoji, K., N. Miki, N. Nakajima, K. Momonoi, C. Kato, and K. Yoshida. 2007. Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions. Plant Cell Physiol. 48:243–251. doi:10.1093/pcp/pcl060

Takeda, K. 2006. Blue metal complex pigments involved in blue flower color. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 82:142–154. doi:10.2183/pjab.82.142

Tsao, C. Y. 2013. Blue flower breeding of *Phalaenopsis*. p.78–85. *in*: Proceeding of Symposium on Orchid

Breeding in Taiwan. October 23, 2013. Taichung, Taiwan. Taiwan Orchid Breeders Soc. Pub., Changhua, Taiwan. (in Chinese)

Tsao, C. Y., U. C. Chen, R. Y. Wu, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2018. Effects of colchicine treatments on polyploidy induction using protocorms of *Phalaenopsis pulcherrima* fma. *coerulea*. J. Taiwan Agric. Res. 67:247–257. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201809_67(3).0002

Wang, Y. T. 2015. Orchid production and market in the United States. p.17–20. *in*: Bloom: Taiwan Orchid Talks. (Lee, N., G. Sung, E. Chou, C. C. Tu, L. Huang, C. Tu, H. Huang, T. Liao, and J. Haskell, eds.) Taiwan Orchid Growers Assoc. Pub. Tainan, Taiwan. 68 pp.

Wu, R. Y., C. Y. Tsao, K. C. Chuang, T. F. Hsieh, C. C. Tsai, Y. C. Yeh, Y. Yang, W. C. Hu, P. H. Sung, and Y. H. Lai. 2016. Breeding on new *Phalaenopsis* varieties by intergenus hybridization. p.41–56. *in*: Proceedings of the Symposium on Strategies of *Phalaenopsis* Breeding and Variety Management. (Wu, R. Y., K. C. Chuang, and T. F. Hsieh, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 195. Yulin, Taiwan. 99 pp. (in Chinese)

Wu, Y. J. 2000. Molecular cloning and expression of flavonoid 3’, 5’-hydroxylase in seed coats of soybean (*Glycine max*). Master Thesis, Department of Agricultural Biotechnology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 98 pp. (in Chinese with English abstract)

Yoshida, K., Y. Toyama-Kato, K. Kameda, and T. Kondo. 2003. Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. Plant Cell Physiol. 44: 262–268. doi:10.1093/pcp/pcg033

Yoshida, K., S. Kitahara, D. Ito, and T. Kondo. 2006. Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. Phytochemistry 67:992–998. doi:10.1016/j.phytochem.2006.03.013

Polyploidization and Selection of Parents for Improving Breeding of Blue-Purple *Phalaenopsis*

Chin-Yi Tsao[1], Uei-Chern Chen[1], Rung-Yi Wu[2], Tzu-Ying Wu[3], and Chi-Ni Hsia[4,*]

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, R. Y. Wu, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2020. Polyploidization and selection of parents for improving breeding of blue-purple *Phalaenopsis*. J. Taiwan Agric. Res. 69(2):154–168.

Polyploidy induction and selection of parents by pH of flower petal were used as strategies for improving breeding of blue-purple *Phalaenopsis* in this study. Using 6-wk-old protocorms of *Phalaenopsis bellina* fma. *coerulea*, *Phalaenopsis equestris* fma. *coerulea* and *Phalaenopsis* Siam Treasure as explants exposed in 0.1 mM colchicine for 8 d to induce polyploidy. Ploidy levels of seedlings derived from colchicine treatments were analyzed by flow cytometry and root tip staining. Results showed that survival rate among two species and one variety were 59.2–85.0%, and their tetraploid induction rates were 27.3–32.9%. Comparison of horticultural traits of diploid and tetraploid plants showed that all tetraploids had firmer petal texture than that of diploids. It was also found that tetraploids of *P. bellina* fma. *coerulea* and *P. equestris* fma. *coerulea* had larger flower diameter than that of their diploids. Although tetraploid plants of *P.* Siam Treasure had similar flower diameter with diploid, tetraploid plants had thicker and shorter stalk than their diploids. The hybridization compatibility of tetraploid plants would need more crossings for investigation for further information. It showed that average pH values of blue-purple petal *Phalaenopsis* were more alkaline (pH about 5.22–5.42) than that of other colors flower. Selection of other colors from *Phalaenopsis* varieties with higher values of petal pH (pH about 5.33–5.38) as parents to cross blue-purple *Phalaenopsis* varieties were conducted in this study. Results showed that a significant higher percentage of 0.2–62.0% blue-purple progeny was found than that of using random parents without pH selection on parents. This pH-based parental selection would improve breeding for blue-purple *Phalaenopsis* varieties.

Key words: Blue-purple *Phalaenopsis*, Cyanidin, Colchicine, Polyploidy, Flow cytometry.

Received: August 8, 2019; Accepted: January 30, 2020.
[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.
[3] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(2):169–183 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202006_69(2).0006

研究報告

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 收集系外表型變異度之探討及白粉病抗感性之檢測

林思妤[1]　黃晉興[2]　王毓華[3,*]

摘要

林思妤、黃晉興、王毓華。2020。甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 收集系外表型變異度之探討及白粉病抗感性之檢測。台灣農業研究 69(2):169–183。

隨著甜瓜消費市場不斷追求更高品質及多樣化果實，再加上急遽環境變化帶來的挑戰，具抗病性、高品質、多樣化外觀的甜瓜新品種之需求逐漸增加。遺傳變異為育種之基礎，種原盤點、變異度探討及抗病性資訊之開發有其必要性。本試驗收集 102 個來自世界各國之甜瓜收集系，並於春作及秋作進行 32 個園藝性狀調查，結果顯示供試品系共涵蓋分類學上 10 個植物分群 (botanical groups)；而經由主成分分析，兩個亞種 *Cucumis melo* ssp. *melo* 及 *Cucumis melo* ssp. *agrestis* 可被清楚區分，而植物分群亦可。白粉病為甜瓜重要病害之一，因此本研究以葉圓片人工接種方式進行白粉病菌生理小種 1 (*Podosphaera xanthii* race 1) 之檢測。兩年試驗結果顯示，30 個品系具有一致抗性，抗性品系主要屬於 reticulatus、momordica 及 acidulus 植物分群。本研究於同一環境調查及評估大量甜瓜收集系特性，不但可節省育種前期性狀篩選時間及人力，調查結果亦可作為後續甜瓜育種之參考，而抗白粉病品系則可應用於甜瓜抗病育種中。

關鍵詞：甜瓜、外表型變異度、白粉病、種原。

前言

甜瓜 (*Cucumis melo* L.)，俗稱美濃瓜、哈密瓜、香瓜及洋香瓜，為全球重要的葫蘆科作物之一，2017 年全球產量高達 31,948,349 Mg (Food and Agriculture Organization of the United Nations n.d.)，具有極高之經濟價值。甜瓜的形態 (morphology) 變異極大 (Burgur *et al*. 2010)，尤其果實相關特性，例如果皮顏色、果實大小、網紋有無、果肉顏色及風味等。其變異性除了可讓消費者欣賞及品嚐多樣化口味，亦提供育種者豐富的基因資源。分類學上，甜瓜可依子房絨毛長短及多寡區分為兩個亞種 (subspecies)：*Cucumis melo* ssp. *agrestis* 及 *Cucumis melo* ssp. *melo*，前者子房絨毛短而疏，後者子房絨毛長而密。兩個亞種下，依花性、果形、果皮特性、果肉色、果肉質地、後熟、香味、甜度及種子形態，可再細分為 16 個植物分群 (botanical groups)，其中 ssp. *agrestis* 分為 5 個植物分群，ssp. *melo* 則包含 11 個植物分群 (Pitrat *et al*. 2000)。

近年來，甜瓜市場上有品種快速更迭之情形，一方面果實外觀 (顏色、果形、紋理等) 多變的品種相繼推出，以因應消費者對甜瓜求新求變的喜好。另一方面，為面對氣候變遷下各種栽培逆境，市場上亦需要各種抗病蟲害、非生物性逆境特性之甜瓜品種，因此多樣性果實外觀及耐逆境甜瓜品種為各國育種家努力之目標。然而，遺傳資源為育種之根本，廣泛的遺傳多樣性則為進行品種改良之基礎。為因應

投稿日期：2019 年 6 月 18 日；接受日期：2020 年 2 月 4 日。
[*] 通訊作者：yhwang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所農場管理組研究員兼組長。台灣 台中市。

目前多變化的甜瓜市場並加速育種時程，有必要釐清種原帶有之特殊性狀，隨時應用於品種改良。然而，目前種原資訊並不充足 (尤其缺乏抗病性資訊)，且因為種原來源不同，評估及檢測方法不同，較缺乏代表性，使得這些種原較難直接應用品種改良。因此，本研究將於相同環境下進行甜瓜收集系重要園藝性狀調查，並針對甜瓜重要病害之一的白粉病進行檢測。

白粉病 (powdery mildew) 為全球甜瓜栽培最常發生之真菌性病害之一，造成甜瓜生長勢低落、葉片提早枯萎等，嚴重影響果實產量及品質。甜瓜白粉病主要病原菌為：*Podosphaera xanthii* (Castag.) Braun & Shishkoff (formerly *Sphaerotheca fuliginea*) 與 *Golovinomyces cichoracearum* (DC) V.P. Heluta (formerly *Erysiphe cichoracearum*)，以前者較普遍，而該病原菌目前有多達 45 個生理小種 (McCreight *et al*. 2012)。在台灣，甜瓜白粉病之病原菌為 *P. xanthii*，目前僅發現生理小種 1 及生理小種 5 (Huang & Wang 2007)。自 1930 年代以來，全球已陸續發現抗白粉病甜瓜種原，多數屬於 momordica 植物分群，少部分屬 acidulus 及 flexuosus，而此些植物分群通常來自印度 (Dogimont 2010–2011; Dhillon *et al*. 2012)。許多研究利用傳統方法或分子工具深入探討抗病基因，目前至少已發現 19 個抗性基因座，多數位於第 2、5、12 條染色體 (Fukino *et al*. 2008; Wang *et al*. 2011; Yuste-Lisbona *et al*. 2011; Fazza *et al*. 2013; Ning *et al*. 2014; Wang *et al*. 2016)。白粉病孢子隨氣流傳播，僅管目前可使用農藥降低白粉病菌之危害，但長期使用農藥勢必須持續面對高成本、耗費人力及破壞生態等問題，並易導致病菌產生抗藥性。因此，育成抗病品種方為解決之道。

遺傳資源為育種之根本，若能掌握甜瓜種原之外表特性及抗病性，即能應用於追求更高品質、符合市場需求且更耐逆境之甜瓜品種。因此，本研究收集各式甜瓜品系，探討其外表型變異度及白粉病抗感性反應，以釐清甜瓜種原之特性，俾有助於提升甜瓜種原利用性，並縮短育種前期種原篩選之人力時間。篩選得到帶有目標特性的種原，亦可直接應用於品種改良。

材料與方法

試驗材料

本試驗甜瓜品系來自行政院農業委員會農業試驗所的種原庫及收集的育種材料，包含地方品系、自交系、系內開放授粉品系，自交代數 1–10 代以上，原產地涵蓋亞洲 (台灣、日本、菲律賓、韓國、泰國、中國大陸、印度、沙烏地阿拉伯、伊朗、土耳其)、美洲 (美國、墨西哥、薩爾瓦多) 及非洲 (辛巴威)，共計 102 個甜瓜品系。

栽培及園藝特性調查方法

2018 年春作及秋作栽種於行政院農業委員會農業試驗所溫網室 (位於台中市霧峰區)，每品系 10 株，採直立式無土栽培法，栽培介質為泥炭土 (BVB substrates, Maasland, The Netherlands)。每植床寬 0.30 m、長 16.50 m、深 0.15 m，每植床種植 2 行，行距 0.20 m、株距 0.36 m。每株留主莖 25–28 片葉供應養分，側枝除留果蔓外全數去除，單株僅留一果。園藝特性調查，依據作物種原中心甜瓜種原調查項目 (https://www.npgrc.tari.gov.tw) 進行，共調查 32 個性狀，包含子葉 3 個、葉 2 個、莖 3 個、花 3 個及果實 21 個性狀，尤其著重於果實特性 (表 1)。

白粉病生理小種 1 抗感病評估方法

分別於 2017 年及 2018 年夏季，依據 Huang *et al*. (2002) 之方法進行 102 個甜瓜種原之白粉病抗感病評估，方法簡述如下：於隔離溫室進行育苗，取 3–4 葉齡植株之葉片清洗消毒後，以表面消毒之金屬圓柱器具切取 1.5 cm 葉圓片。置於含有養液之 6 cm 塑膠培養皿內，每皿皆含對照品系 IRANH (感病) 及 PMR45 (抗病)。每品系 2 重複，每重複兩個葉圓片，另有一對照組不接菌。接種源為 *Podosphaera xanthii* race 1 (Px-274)，以加壓氣流將孢子均勻吹落於葉圓片上，使接種源濃度在 50–100 spore cm^{-2}。培養皿密封後置於

表 1. 甜瓜收集系園藝性狀調查項目列表。

Table 1. Table of horticultural traits measured in 102 melon accessions.

Organ	Trait	Descriptive value
Cotyledon	Cotyledon length (cm)	
	Cotyledon width (cm)	
	Cotyledon color	1 (light green), 2 (green), 3 (dark green)
Vine	Vine diameter (mm)	
	length of internode (10–15) (cm)	
Leaf	Prominence of lobing	1 (week), 2 (medium), 3 (strong)
	Leaf length (cm)	
	Leaf width (cm)	
Flower	Sex expression	1 (gynoecious), 2 (monoecious), 3 (andromonoecious)
	Ovary shape	1 (round), 2 (elliptics), 3 (long elliptics), 4 (oval), 5(elongated)
	Ovary pubescence	1 (sparse), 2 (medium), 3 (abundant)
Fruit	Days from flowering to harvest	
	Fruit shape	1 (oblate), 2 (globose), 3 (high globose), 4(elliptic), 5 (oval), 6 (oblong), 7 (elongated), 8 (pear shaped), 9 (long cylindrical)
	Pistil scar size (cm)	
	Ease of abscission of peduncle	1 (strong), 2 (medium), 3 (weak), 4 (absent)
	Fruit length in longitudinal section (cm)	
	Fruit diameter in cross section (cm)	
	Fruit weight (g)	
	Length of peduncle (cm)	
	Skin color of immature fruit	1 (white), 2 (light green), 3 (dark green)
	Skin color of ripe fruit	1 (white), 2 (greenish white), 3 (light yellow), 4 (yellow), 5 (deep yellow), 6 (pink), 7 (yellowish green), 8 (light green), 9 (green), 10 (bluish green), 11 (deep green), 12 (dark green), 13 (pale yellowish white), 14 (pale yellowish green), 15 (cream white)
	Fruit coat patches	1 (green patches), 2 (dark green patches), 3 (absent)
	Fruit surface	1 (smooth), 2 (slight rough), 3 (rough), 4 (creasy), 5 (grooved)
	Surface grooves	1 (absent), 2 (weak), 3 (medium), 4 (strong)
	Fruit ribs	1 (absent), 2 (shallow), 3 (medium), 4 (prominent)
	Easiness of fruit crack	1 (strong), 2 (medium), 3 (weak)
	Width of grooves	1 (absent), 2 (narrow), 3 (medium), 4 (thick)
	Creasing of surface	1 (week), 2 (medium), 3 (strong)
	Flesh color	1 (cream-white), 2 (yellowish green), 3 (light green), 4 (green), 5 (light orange), 6 (orange), 7 (red orange)
	Flesh texture	1 (soft), 2 (loose), 3 (crisp)
	Average fruit thickness (cm)	
	Average sugar content (°Brix)	

24℃/18℃ (日/夜) 光照 12 h 之定溫箱中，培養 10 d 後於顯微鏡下觀察病斑面積以判定發病指數 (disease index; DI)。

發病指數分為 0–9 共 10 級：0 級-無病斑；1 級-病斑占葉面積 10%；2 級-病斑占葉面積 30%；3 級-病斑占葉面積 50%；4 級-病斑占葉面積 60%；5 級-病斑占葉面積 70%；6 級-病斑占葉面積 80%；7 級-病斑占葉面積 100%

但孢子量稀薄；8 級-病斑占葉面積 100%；9 級-病斑占葉面積 100% 而孢子量厚實且葉片圓片褐化 (Mohamed *et al*. 1995; Huang *et al*. 2002)。發病指數 ≤ 3 視為抗病，而發病指數 > 3 則視為感病。

資料分析

甜瓜外表性狀調查資料及白粉病抗感性檢測資料，係使用 Microsoft Excel 2013 進行敘述統計分析並繪製圖表。主成分分析 (principle component analysis; PCA) 則是以 102 個甜瓜收集系之 32 個外表性狀為資料，在 R 語言統計軟體環境下，以 factoextra 套件進行分析及繪圖 (Kassambara & Mundt 2019)。

結果

甜瓜收集系之分類

甜瓜可依子房絨毛長短及多寡區分為兩個亞種 (Jeffrey 1980)，本研究收集之 102 個甜瓜品系中，在亞種層級之分類 (圖 1A)，34% 屬於 ssp. *agestis*、53% 為 ssp. *melo*，而 13% 無法歸類。在生物群層級 (圖 1B)，共涵蓋 Pitrat *et al*. (2000) 定義 16 個植物分群中的 10 個植物分群，makuwa、momordica、acidulus、chinenesis 為 ssp. *agestis*，adana、cantalupensis、reticulatus、inodorus、dudaim 及 chandalak 屬 ssp. *melo*。其中，又以 reticulatus 植物分群品系數量最多 (24%)，inodorus 次之 (14%)，而後依序為 momordica (11%)、makuwa (8%) 及 cantalupensis (7%)，22% 無法歸類。

甜瓜收集系之外觀特性

比較 102 個甜瓜收集系於春作及秋作之整體表現 (表 2)，子葉長寬無顯著差異，其餘性狀兩季的表現有顯著差異。完全展開葉之長寬，在秋作較春作分別大 1.3 cm 及 1.8 cm，開花至採收日數秋作比春作長 8 d。果實縱徑、橫徑、重量及果肉厚度，秋作較春作分別長 1.9 cm、寬 1.5 cm、重 256.1 g 及厚 0.3 cm。而在糖度上，秋作亦比春作高約 1.8°Brix。

在花及果實的特性上，以雄花、兩性花同株 (68%) 較雌雄異花同株 (32%) 比例高，子房絨毛少、中、多分別為 31%、23%、46%。果形上以球形最多 (29%)，橢圓 (15%)、長橢圓 (15%)、扁圓 (14%) 及長圓柱 (12%) 次之。成熟果果色綠色系占 54%、黃色系占 37%，而白色系占 9%。果肉色白肉占 33%、綠肉 37% 及紅肉 30%，而肉質則以軟 (53%) 及脆 (43%) 為大宗 (圖 2–3)。

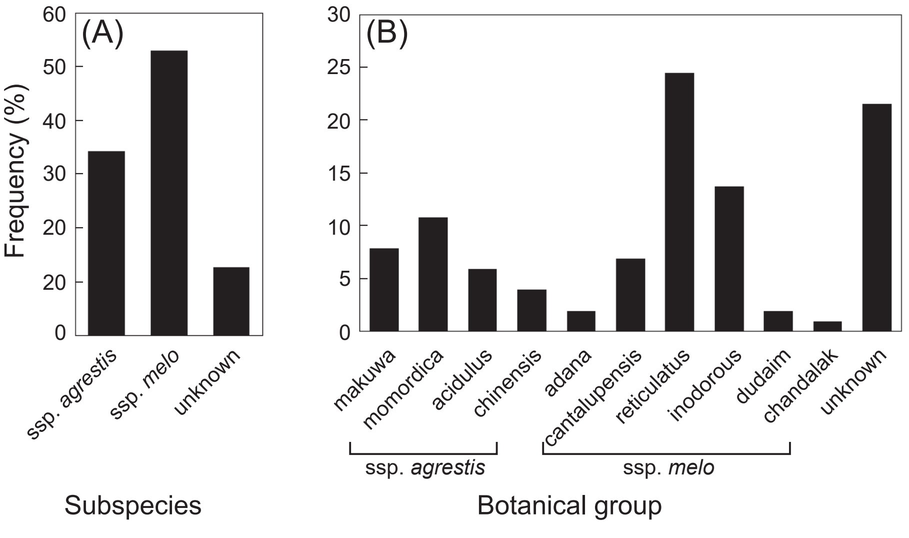

圖 1. 甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 收集系各分類所占比率，(A) 以亞種區分；(B) 以植物分群區分。

Fig. 1. Frequency of (A) subspecies and (B) botanical groups in melon accessions.

表 2. 春作及秋作 102 個甜瓜收集系數量性狀之分布。

Table 2. Distribution of quantitative traits among 102 melon accessions in two seasons.

	Average		Quartile									
	Mean ± SD		Min		First quartile		Median		Third quartile		Max	
Trait	Spring	Fall	Spring	Fall	Spring	Fall	Spring	Fall	Spring	Fall	Spring	Fall
Cotyledon length (cm)	3.3 ± 0.7	3.5 ± 0.8	1.4	1.5	2.8	3.0	3.3	3.5	3.8	4.0	5.3	5.2
Cotyledon width (cm)	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.1	0.7	1.7	1.8	2.0	2.0	2.1	2.3	2.7	2.6
Vine diameter (mm)	6.2 ± 1.3	6.1 ± 1.1**	3.6	3.8	5.2	5.3	6.1	5.9	7.1	6.7	9.7	9.4
Average length of 10–15 internode (cm)	8.0 ± 1.3	9.0 ± 1.2**	4.9	6.2	7.1	8.2	8.1	9.0	8.8	9.9	10.8	11.8
Leaf length (cm)	17.0 ± 2.1	18.3 ± 2.6**	10.7	11.7	15.4	16.5	17.3	18.3	18.4	20.1	21.7	23.6
Leaf width (cm)	16.6 ± 2.3	18.4 ± 2.6**	10.5	11.9	15.1	16.7	16.6	18.0	18.1	20.4	21.2	24.6
Petiole length (cm)	11.2 ± 1.8	-	6.9	-	9.9	-	11.0	-	12.3	-	17.2	-
Days from flowering to harvest (d)	36.5 ± 6.6	44.5 ± 6.9**	23.0	27.0	31.3	40.3	35.8	45.3	41.8	49.1	51.1	66.9
Pistil scar size (cm)	-	1.6 ± 1.0	-	0.1	-	0.8	-	1.5	-	2.2	-	4.9
Fruit length in longitudinal section (cm)	11.0 ± 3.6	12.9 ± 3.8**	4.8	5.6	8.7	10.4	10.4	12.4	12.5	14.5	24.7	27.2
Fruit diameter in cross section (cm)	9.0 ± 1.9	10.5 ± 1.9**	3.5	4.2	8.1	9.4	9.0	10.6	10.1	11.7	13.0	14.3
Fruit weight (g)	493.9 ± 225.4	750.0 ± 322.0**	35.1	55.1	320.5	539.1	465.6	685.4	651.3	951.7	1,027.2	1,797.3
Length of peduncle (cm)	-	1.9 ± 1.0	-	0.5	-	1.2	-	1.7	-	2.3	-	7.0
Average fruit thickness (cm)	2.3 ± 0.7	2.6 ± 0.7**	0.6	0.8	1.8	2.1	2.2	2.7	2.7	3.1	3.6	4.1
Average sugar content (°Bx)	5.6 ± 2.4	7.4 ± 3.3**	1.0	1.6	3.4	4.3	5.3	7.9	7.0	10.0	13.5	14.7

**Mean of trait measured in spring and fall are significantly different at $P < 0.01$ by Student's *t*-test.

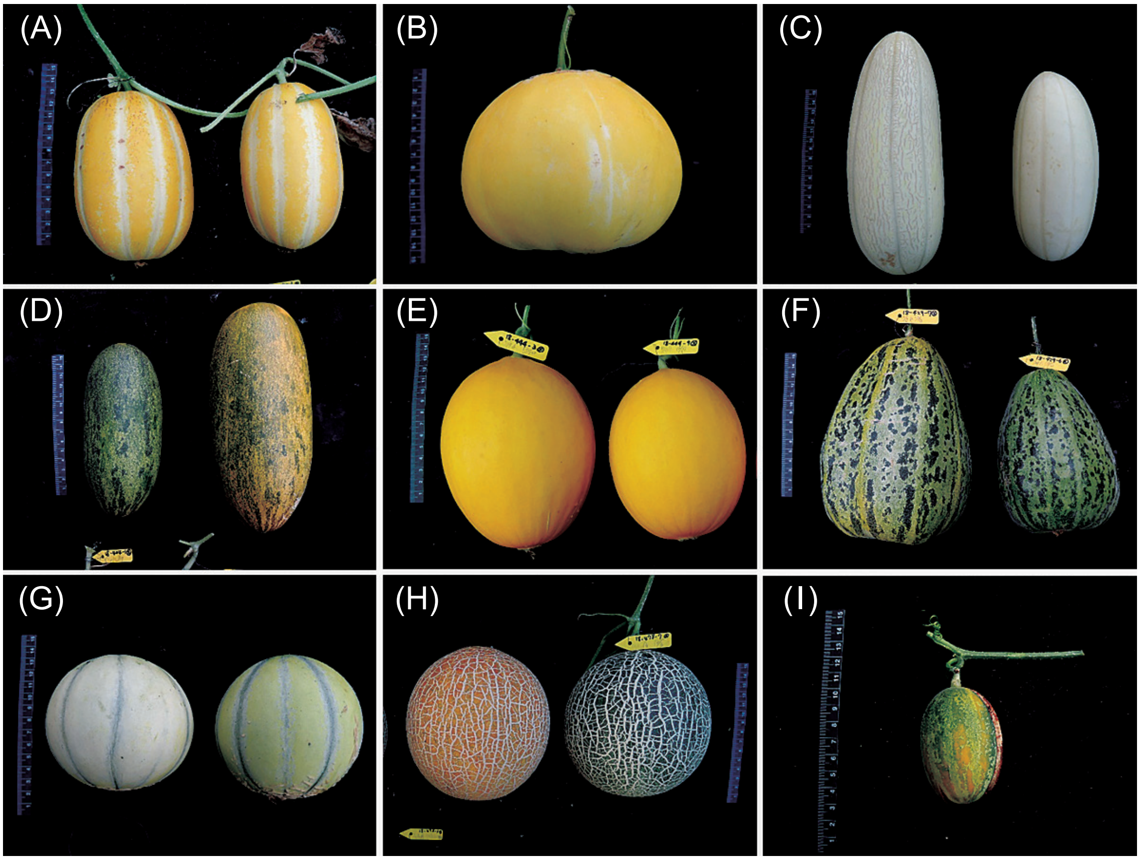

圖 2.　甜瓜果實之多樣化外觀。(A–B) Makuwa; (C–D) momordica; (E) inodorus; (F) chinensis; (G) cantalupensis; (H) reticulatus; (I) wild melon。

Fig. 2.　High diversity of melon fruit. (A–B) Makuwa; (C–D) momordica; (E) inodorus; (F) chinensis; (G) cantalupensis; (H) reticulatus; and (I) wild melon.

主成分分析

為探討 102 個甜瓜收集系之外表型變異度，本試驗利用 32 個外表特性進行主成分分析。結果顯示，第一、第二及第三主成分分別解釋 20.8、14.1 及 9.2% 之變異，第一主成分主要由果肉厚、子房絨毛、果面網紋所影響，第二主成分由果實縱徑、果重所影響，第三主成分則主要受果蒂部脫落性、果面皺紋多少、葉片長寬、肉質及開花至採收日數所影響。兩亞種可由第二主成分明顯區分，ssp. *melo* 主要分布於第一及第四象限，ssp. *agrestis* 坐落於第二及第三象限 (圖 4A)。

亞種下再細分為植物分群 (圖 4B)，ssp. *melo* 中，reticulatus 收集系全數位於第一及第四象限，且明顯群聚並與 ssp. *agrestis* 距離較遠；cantalupensis 亦全數分布於第一及第四象限，但距離 ssp. *agrestis* 較近；inodorus 則分布於原點附近，不過仍偏向圖右側。在 ssp. *agrestis* 中，makuwa 明顯群聚並位於第二象限，momordica 大部分坐落於第三象限，acidulus 則位於第二及第三象限交界，且 momordica 與 acidulus 並無法明顯區分。

甜瓜收集系之白粉病抗感性

白粉病生理小種 1 之抗感性檢測結果顯示 (表 3–4)，2017 年 102 個甜瓜收集系中共 36 個品系具抗性，63 個品系為感病；2018 年則是 39 個品系具抗性，55 個品系為感病。比較

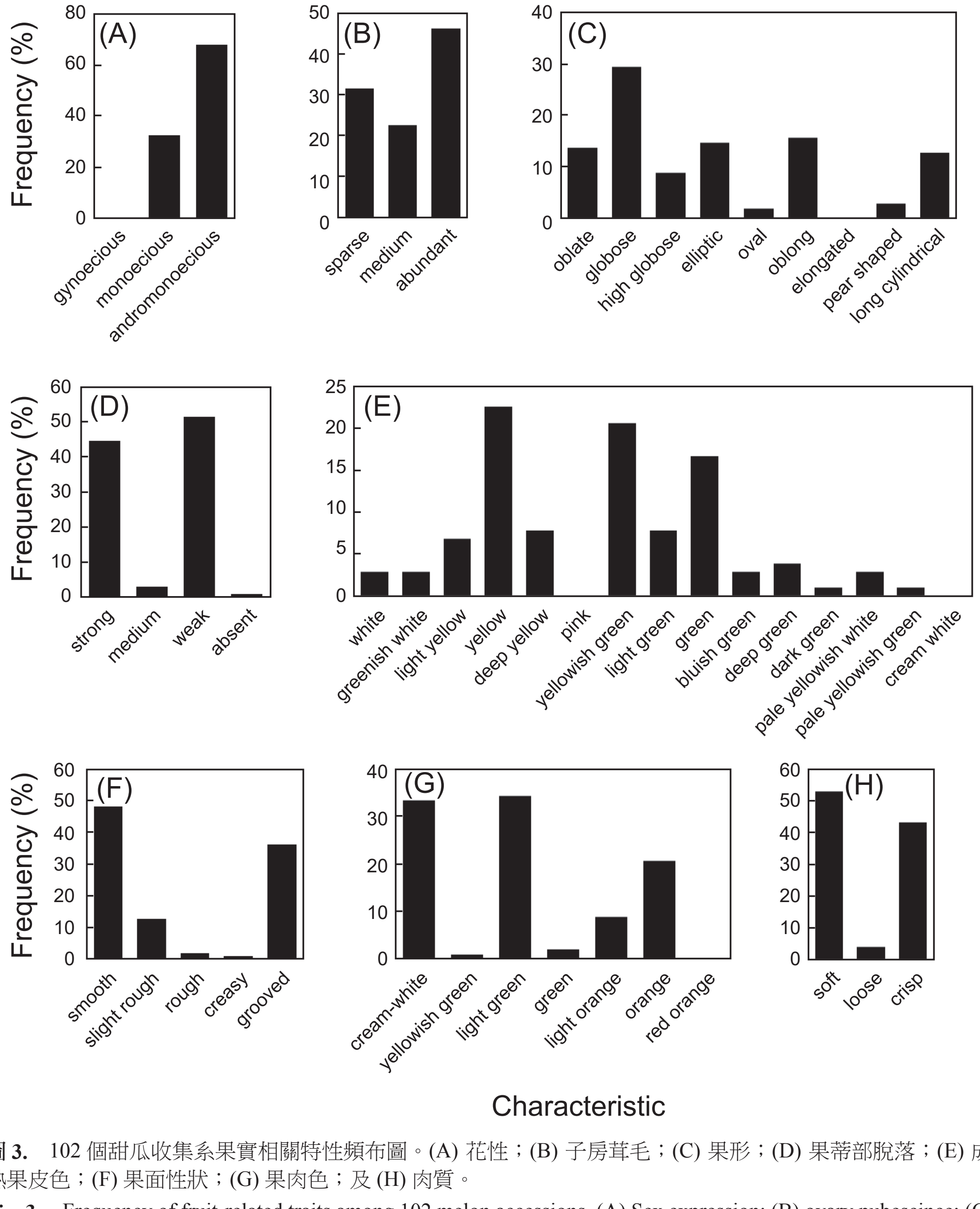

圖 3. 102 個甜瓜收集系果實相關特性頻布圖。(A) 花性；(B) 子房茸毛；(C) 果形；(D) 果蒂部脫落；(E) 成熟果皮色；(F) 果面性狀；(G) 果肉色；及 (H) 肉質。

Fig. 3. Frequency of fruit-related traits among 102 melon accessions. (A) Sex expression; (B) ovary pubescince; (C) fruit shape; (D) ease of abscission of peduncle; (E) skin color of ripe fruit; (F) fruit surface; (G) flesh color; and (H) flesh texture.

兩年抗感性反應，皆表現抗病之品系為 30 個，皆表現感病為 50 個品系；而在 30 個抗性穩定之品系中，16 個品系兩年皆為極抗 (發病指數 = 0)，包含 5 個白粉病鑑別品種 (Edisto47、PI414723、PI124112、PMR5 及 MR-1) 及 11 個種原。

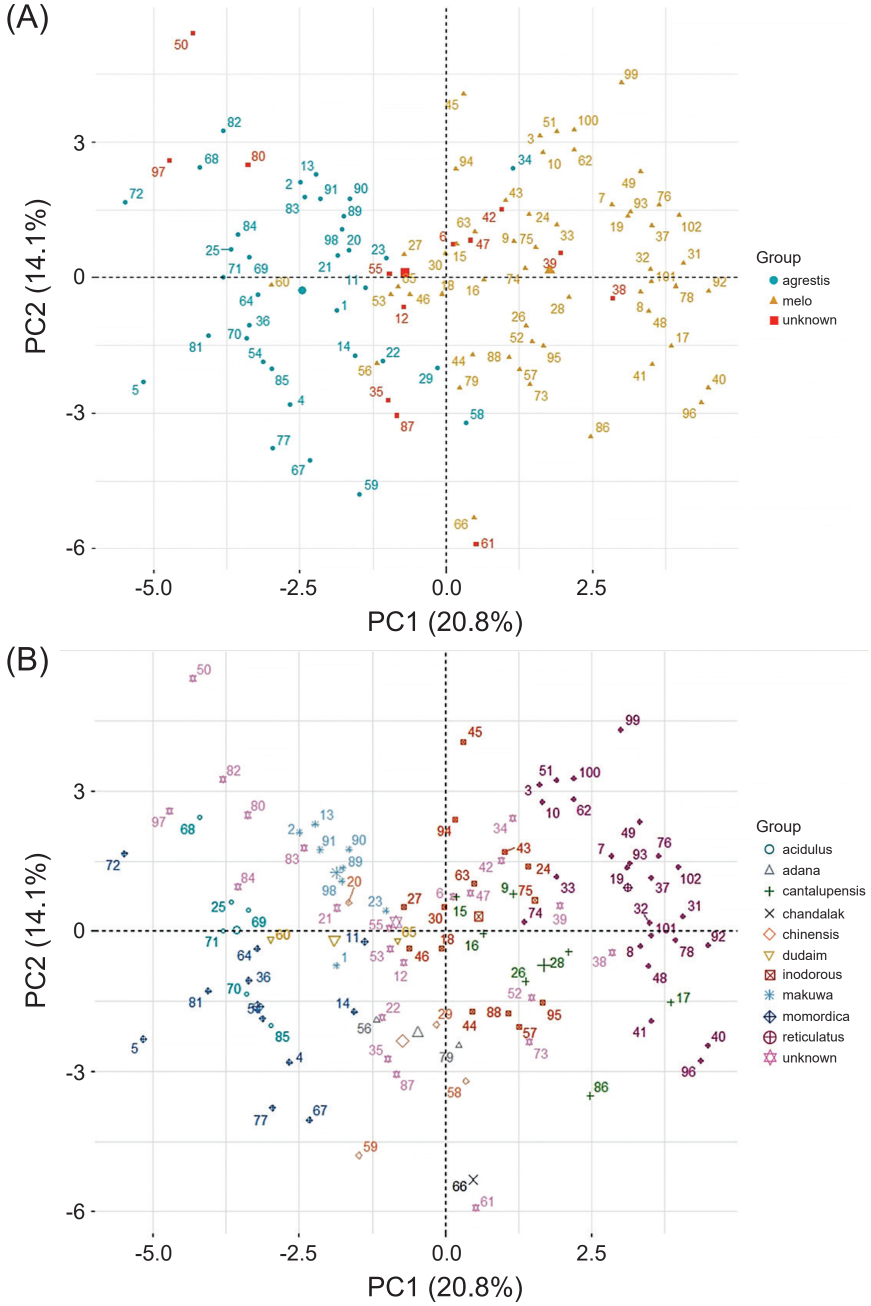

圖 4.　102 個甜瓜收集系之主成分分析圖。(A) 顯示亞種；(B) 顯示植物分群。

Fig. 4.　Principal component (PC) analysis of 32 morphological traits in 102 melon accessions. Two classifications are shown: (A) subspecies and (B) botanical groups.

討論

將現有種原進行歸類有助於釐清材料背景，應用於育種上時即可依目的選擇親緣遠近不同之品系進行雜交。本研究供試材料 102 個甜瓜收集系，根據種原資料至少來自 14 個

表 3. 甜瓜收集系對白粉病生理小種 1 抗感性反應。

Table 3. Susceptibility to powdery mildew race 1 in melon accessions.

Susceptibility	Number of accessions		
	2017	2018	Same reaction in two years
Resistant (DI[z] ≤ 3)	36	39	30
Susceptible (DI > 3)	63	55	50

[z] DI: disease index.

表 4. 甜瓜收集系 2017 年及 2018 年之白粉病生理小種 1 抗感病檢測。

Table 4. Susceptible reaction of melon accessions against powdery mildew race 1 in 2017 and 2018.

No.	Accession	2017		2018		Same reaction in two years
		Rating	Reaction[z]	Rating	Reaction	
1	PI 381775	6.5	S	5.5	S	*
2	PI 378062	6.0	S	4.8	S	*
3	Edisto 47	0.0	R	0.0	R	*
4	PI414723	0.0	R	0.0	R	*
5	PI124112	0.0	R	0.0	R	*
6	IRAN-H	7.3	S	6.5	S	*
7	PMR5	0.0	R	0.0	R	*
8	PMR45	-	-	0.0	R	
9	Vedrantais	7.5	S	6.0	S	*
10	Nantais oblong	0.0	R	1.3	R	*
11	MR-1	0.0	R	0.0	R	*
12	PI 180280	8.0	S	6.8	S	*
13	Charentais Fom-2	6.5	S	5.0	S	*
14	WMR-29	0.0	R	5.0	S	
15	Charentais T	6.3	S	5.3	S	*
16	Charentais FOM-1	6.3	S	5.3	S	*
17	Cezanne Hybride	4.3	S	1.0	R	
18	CM17524	6.8	S	2.8	R	
19	CM17526	0.0	R	0.0	R	*
20	PI 157076	6.5	S	4.8	S	*
21	PI 323498	6.0	S	-	-	
22	PI 420145	7.3	S	-	-	
23	Charentais FOM-2	6.8	S	-	-	
24	CM17620	1.5	R	3.0	R	*
25	PI 313970	4.0	S	6.8	S	*
26	Isabelle	6.8	S	-	-	
27	Des Canaries	6.5	S	6.5	S	*
28	Santon	6.5	S	6.3	S	*
29	PI 161375	5.0	S	6.5	S	*
30	CM17221	5.3	S	2.8	R	

[z] R and S denote resistance and susceptibility, respectively.

表 **4.** 甜瓜收集系 2017 年及 2018 年之白粉病生理小種 1 抗感病檢測 (續)。

Table 4. Susceptible reaction of melon accessions against powdery mildew race 1 in 2017 and 2018. (continued)

No.	Accession	2017		2018		Same reaction in two years
		Rating	Reaction[z]	Rating	Reaction	
31	CM17230	5.8	S	2.5	R	
32	CM17231	7.5	S	6.5	S	*
33	CM17242	3.3	S	6.3	S	*
34	CM17254	2.8	R	6.3	S	
35	05A05900	7.5	S	6.8	S	*
36	CM17342	6.3	S	5.0	S	*
37	CM17344	0.0	R	0.0	R	*
38	CM17349	7.3	S	6.5	S	*
39	CM17351	0.0	R	0.0	R	*
40	CM17352	0.0	R	0.0	R	*
41	CM17354	0.0	R	1.3	R	*
42	CM17355	7.5	S	6.5	S	*
43	CM17409	7.0	S	6.8	S	*
44	CM17413	6.3	S	6.5	S	*
45	TVI11851	6.5	S	6.3	S	*
46	CM17414	6.3	S	6.5	S	*
47	CM17456	6.5	S	5.8	S	*
48	CM17460	0.0	R	0.0	R	*
49	CM17463	0.0	R	0.0	R	*
50	CM17464	5.8	S	5.8	S	*
51	PI 176925	8.0	S	6.5	S	*
52	PI 304745	7.5	S	6.3	S	*
53	475747	1.0	R	0.0	R	*
54	164569	5.5	S	3.3	S	*
55	164750	6.0	S	6.5	S	*
56	165514	0.0	R	0.0	R	*
57	174814	7.3	S	6.5	S	*
58	179669	7.0	S	6.0	S	*
59	98A00143	0.0	R	0.0	R	*
60	179905	6.8	S	6.5	S	*
61	182941	8.0	S	4.3	S	*
62	CM17497	0.3	R	0.0	R	*
63	CM17520	-	-	2.0	R	
64	PI 180281	1.5	R	2.5	R	*
65	PI 211922	7.0	S	6.3	S	*
66	PI 307588	7.5	S	6.5	S	*
67	PI 370021	5.0	S	1.8	R	
68	PI 442178	5.0	S	5.8	S	*
69	PI 482397	5.5	S	4.5	S	*

[z] R and S denote resistance and susceptibility, respectively.

表 **4.** 甜瓜收集系 2017 年及 2018 年之白粉病生理小種 1 抗感病檢測 (續)。

Table 4. Susceptible reaction of melon accessions against powdery mildew race 1 in 2017 and 2018. (continued)

No.	Accession	2017		2018		Same reaction in two years
		Rating	Reaction[z]	Rating	Reaction	
70	PI 482400	2.8	R	0.8	R	*
71	PI 482401	5.5	S	1.8	R	
72	PI 482429	0.8	R	-	-	
73	CM17591	2.5	R	0.0	R	*
74	CM17613	1.0	R	0.3	R	*
75	CM17516	7.5	S	6.3	S	*
76	CM17635	6.0	S	-	-	
77	CM17698	6.0	S	5.3	S	*
78	CM17720	0.0	R	0.0	R	*
79	179916	2.5	R	4.0	S	
80	183048	3.5	S	4.0	S	*
81	381775	6.0	S	7.0	S	*
82	PI 482393	-	-	7.3	S	
83	PI 482398	3.5	S	6.5	S	*
84	PI 482399	2.8	R	2.5	R	*
85	PI 482422	1.5	R	0.0	R	*
86	CM17759	0.0	R	5.8	S	
87	CM17767	6.5	S	6.8	S	*
88	CM17631	1.5	R	0.5	R	*
89	CM17209	6.3	S	6.5	S	*
90	CM17214	6.8	S	5.8	S	*
91	CM17215	6.8	S	7.5	S	*
92	CM17233	7.5	S	7.0	S	*
93	CM17239	0.0	R	0.5	R	*
94	CM17587	7.3	S	6.8	S	*
95	CM17600	7.0	S	-	-	
96	CM17692	0.0	R	0.0	R	*
97	CM17697	6.0	S	6.0	S	*
98	CM17713	6.5	S	5.3	S	*
99	CM17754	1.0	R	1.5	R	*
100	CM17757	4.8	S	-	-	
101	CM17770	2.3	R	1.3	R	*
102	CM17772	0.0	R	0.0	R	*

[z] R and S denote resistance and susceptibility, respectively.

國家，其組成 34% 屬於 ssp. *agestis*、53% 為 ssp. *melo*。由於甜瓜亞種是以子房絨毛長短進行分類，而非野生種與栽培種，且兩個亞種皆含目前常見栽培種，因此兩亞種數量不會差距懸殊。亞種下再細分為植物分群層 (Pitrat *et al*. 2000)，以 reticulatus、inodorus、momordica、makuwa 及 cantalupensis 為大宗 (共 64%)。此些植物分群數量較多之原因，是由於長期以來

受到消費喜好的影響，經由高度人為選拔的干擾，造成市面上收集系通常屬此些植物分群 (momordica 除外)，這些植物分群具甜味且通常香氣強。而 momordica 不具甜味及香氣卻在種原中為數不少，是由於許多抗病品系屬於此植物分群所導致 (Dogimont 2010–2011; Dhillon *et al*. 2012)。

台灣常見品種亦多來自這些植物分群，市場上通常將甜瓜分為薄皮甜瓜 (美濃瓜) 及厚皮甜瓜。厚皮甜瓜下又分為網紋甜瓜、光皮甜瓜及哈密瓜，薄皮甜瓜通常屬 *agrestis* 亞種之 makuwa 植物分群。厚皮甜瓜為 *melo* 亞種，其中網紋甜瓜及哈密瓜屬 reticulatus 或 cantalupensis，光皮甜瓜則屬 inodorus 植物分群。此外，以亞種或植物分群分類皆有部分品系 (13% 及 22%) 難以歸類，因為不同植物分群間並無雜交障礙 (Decker-Walters *et al*. 2002)，甚至極易雜交所造成，因此會有部分品系同時含有多個植物分群特性之情形發生。

為完善甜瓜收集系重要園藝特性資料，以利後續育種應用，本研究 2018 年春作及秋作於相同溫網室中進行 102 個甜瓜收集系之種植及調查。比較兩期作之整體表現 (表 2)，僅子葉大小無顯著差異，顯示子葉大小較不易受環境影響，而其餘性狀兩期作間皆有顯著差異，說明其易受環境影響。整體來看，秋作果實表現較佳，包含甜度較高、果實較大、果重較重及果肉較厚，此差異應為秋作生育期溫度由暖至冷，果實膨大及成熟期日夜溫度差異較大造成；而開花至採收日數秋作較長，亦因結果期溫度較低影響生長及成熟速度所造成。然而上述為整體 102 個收集系之表現，應用於育種時仍需以單一收集系資料為準。

外表性狀調查之紀錄，可協助以客觀方式記錄植株特性，盡量摒除不同調查人員造成之誤差。而此時甜瓜特性調查記錄表，便為各國進行種原調查與品種鑑別時重要參考依據，以及資料互通之基準。然而，部分調查標準僅以描述性文字記錄而非數值，例如國際植物品種權保護同盟 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants; UPOV) 之甜瓜特性調查表之果實長短僅以等級 (非常短、短、中、長、非常長) 記錄，造成個人主觀嚴重影響紀錄之情形。若各等級有對應之數值作為參考，就能大幅度降低人為主觀判斷之影響。本研究之甜瓜材料包含大量種原並涵蓋多個植物分群，亦收集兩個期作之資料，其統計數據 (四分位數及最小最大值等) 可作為調查紀錄等級劃分之參考。

在外表型變異度方面，主成分分析結果顯示 (圖 4)，102 個甜瓜品系在外表特性上並無明顯集中或重複之情形，說明供試品系外表特性變異大且分布均勻。另外，由圖中可見，兩個亞種 ssp. *agrestis* 及 ssp. *melo* 可明顯分開，此與前人利用外表型或基因型進行主成分分析之結果一致 (Leida *et al*. 2015; Nimmakayala *et al*. 2016; Nunes *et al*. 2017)。而兩群中間亦有部分重疊處，這顯示兩亞種間可雜交之特性，而無法歸類於兩亞種之品系多數座落於兩亞種交界亦為證明 (Hu *et al*. 2015)。從植物分群層面來看，ssp. *melo* 中 reticulatus 在圖中最右側，與 ssp. *agrestis* 距離最遠且與其它同屬 ssp. *melo* 的植物分群明顯分離，顯示其外表型與其他植物分群差異較大。inodorus 及 cantalupensis 與 ssp. *agrestis* 距離較近，與 Liu *et al*. (2004) 分析 72 個甜瓜收集系外表特性之結果相符。ssp. *agrestis* 中，momordica 與 acidulus 無法明顯區分，可能是因為兩者果實外觀十分相近，主要差別為果實成熟期 (授粉至收穫天數) 長短。momordica 較早熟，以本研究結果為 36.9 d，acidulus 成熟期長，平均 44.8 d。另外，亦有研究指出兩者差異為儲架壽命，momordica 可存放至少 6 mo，而 acidulus 儲架壽命短且成熟果易裂 (Manohar & Murthy 2012)。

為了克服氣候變遷帶來的栽培逆境且不斷地追求果實品質，近年來配合栽培技術的改善。目前設施栽培甜瓜逐漸普遍，然而設施栽培降低急遽氣候的威脅，卻也提供白粉病菌適合之發病環境。有鑒於長期使用農藥會造成環境負擔並衍生食安問題，最有效且經濟的方法為育成抗病品種。而進行白粉病抗性甜瓜育種的第一步，便為篩選出具穩定抗性之收集系。台灣目前以白粉病生理小種 1 較為盛行 (Huang

& Wang 2007)，因此本研究於 2017 年及 2018 年利用葉圓片人工接種法進行 102 個甜瓜收集系之白粉病生理小種 1 之抗感病檢測。結果顯示，30 個品系於兩年皆呈抗性，其中 57% 屬於 reticulatus、13% 屬 momordica 及 7% 為 acidulus 植物分群。全球最早發現之白粉病抗病種原為 momordica 及 acidulus (Dogimont 2010–2011; Dhillon *et al*. 2012)，本研究結果亦顯示許多抗白粉病種原屬於此兩植物分群；而最多抗白粉病收集系屬 reticulatus，應是經過數十年育種發展。在高度人為選拔下，導入受市場歡迎之 reticulatus 品系中 (多為網紋洋香瓜)。另外，經由觀察抗性品系之植物分群，發現同為主要市售品種所屬之植物分群 inodorus (多為光皮甜瓜)，僅 1 個品系具穩定抗性，而 makuwa (薄皮甜瓜類) 並無穩定抗性品系。因此，未來可將白粉病抗性基因導入此些植物分群中，增加市場上抗性品種之選擇。另外，有 11 個品系之白粉病抗感性表現兩年不一致之情形，可能為種原遺傳背景尚在分離所導致。

遺傳資源為育種之根本，因此在跟隨甜瓜市場需求進行品種改良的同時，必須先對甜瓜種原有更深入瞭解。本研究盤點及調查 102 個來自世界各地之甜瓜收集系，依據其外表形態進行分類及歧異度探討，亦針對甜瓜全球性重要病害的白粉病進行評估，篩選得到之抗病品系將可應用於後續品種改良以及抗病基因之探勘。本研究完善甜瓜種原之資訊，將提升種原之利用率，並減少育種前期種原評估之人力物力，加速新品種之育成，以符合甜瓜市場上品種快速更迭之需求。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會 107 農科-19.1.3-農-C1 計畫經費支持，謹致謝忱。

引用文獻

Burger, Y., H. S. Paris, R. Cohen, N. Katzir, Y. Tadmor, E. Lewinsohn, and A. A. Schaffer. 2010. Genetic diversity of *Cucumis melo*. p.165–198. *in*: Horticultural Reviews, Volume 36. (Janick, J., ed.) Wiley. New York, NY. 363 pp. doi:10.1002/9780470527238.ch3

Decker-Walters, D. S., S. M. Chung, J. E. Staub, H. D. Quemada, and A. I. López-Sesé. 2002. The origin and genetic affinities of wild populations of melon (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) in North America. Plant Syst. Evol. 233:183–197. doi:10.1007/s00606-002-0191-3

Dhillon, N. P. S., A. J. Monforte, M. Pitrat, S. Pandey, P. K. Singh, K. R. Reitsma, J. Garcia-Mas, A. Sharma, and J. D. McCreight. 2012. Melon landraces of India: Contributions and importance. p.85−150. *in*: Plant Breeding Reviews, Volume 35. (Janick, J., ed.) Wiley. New York, NY. 407 pp. doi:10.1002/9781118100509.ch3

Dogimont, C. 2010–2011. 2011 gene list for melon. Cucurbit Genet. Coop. 33–34:104−133.

Fazza, A. C., L. J. Dallagnol, A. C. Fazza, C. C. Monteiro, B. M. de Lima, D. T. Wassano, and L. E. A. Camargo. 2013. Mapping of resistance genes to races 1, 3 and 5 of *Podosphaera xanthii* in melon PI 414723. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 13:349−355. doi:10.1590/S1984-70332013000400005

Food and Agriculture Organization of the United Nations. n.d. Data. http://www.fao.org/faostat/en/#data (visit on 04/30/2019)

Fukino, N., T. Ohara, A. J. Monforte, M. Sugiyama, Y. Sakata, M. Kunihisa, and S. Matsumoto. 2008. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). Theor. Appl. Genet. 118:165−175. doi:10.1007/s00122-008-0885-1

Hu, J., P. Wang, Y. Su, R. Wang, Q. Li, and K. Sun. 2015. Microsatellite diversity, population structure, and core collection formation in melon germplasm. Plant Mol. Biol. Rep. 33:439−447. doi:10.1007/s11105-014-0757-6

Huang, J. H., Y. H. Wang, and C. T. Lo. 2002. Development of leaf-disk method for screening melon varieties resistant to *Sphaerotheca fuliginea* race. J. Agric. Res. China 51:49−56. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.200212.0005

Huang, J. H. and Y. H. Wang. 2007. The races of *Podosphaera xanthii* causing melon powdery mildew in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 56:307−315. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2007.05604.06

Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. Bot. J. Linn. Soc. 81:233−247. doi:10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.x

Kassambara, A. and F. Mundt. 2019. Factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. https://cran.r-project.org/web/packages/factoex-

tra/index.html (visit on 02/03/2019)

Leida, C., C. Moser, C. Esteras, R. Sulpice, J. E. Lunn, F. de Langen, A. J. Monforte, and B. Picó. 2015. Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). BMC Genet. 16:28. doi:10.1186/s12863-015-0183-2

Liu, L., F. Kakihara, and M. Kato. 2004. Characterization of six varieties of *Cucumis melo* L. based on morphological and physiological characters, including shelf-life of fruit. Euphytica 135:305–313. doi:10.1023/b:euph.0000013330.66819.6f

Manohar, S. H., and H. N. Murthy. 2012. Estimation of phenotypic divergence in a collection of *Cucumis melo*, including shelf-life of fruit. Sci. Hortic. 148:74–82. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.025

McCreight, J. D., M. D. Coffey, B. Sedlakova, and A. Lebeda. 2012. Cucurbit powdery mildew of melon incited by *Podosphaera xanthii*: Global and western U.S. perspectives. p.181–189. *in*: Cucurbitaceae 2012. Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae. October 15–18, 2012. Antalya, Turkey. Çukurova Univ., Antalya, Turkey.

Mohamed, Y. F., M. Bardin, P. C. Nicot, and M. Pitrat. 1995. Causal agents of powdery mildew of cucurbits in Sudan. Plant Dis. 79:634–636.

Nimmakayala, P., Y. R. Tomason, V. L. Abburi, A. Alvarado, T. Saminathan, V. G. Vajja, G. Salazar, G. K. Panicker, A. Levi, W. P. Wechter, J. D. McCreight, A. B. Korol, Y. Ronin, J. Garcia-Mas, and U. K. Reddy. 2016. Genome-wide differentiation of various melon horticultural groups for use in GWAS for fruit firmness and construction of a high resolution genetic map. Front. Plant Sci. 7:1437. doi:10.3389/fpls.2016.01437

Ning, X., X. Wang, X. Gao, Z. Zhang, L. Zhang, W. Yan, and G. Li. 2014. Inheritances and location of powdery mildew resistance gene in melon Edisto47. Euphytica 195:345–353. doi:10.1007/s10681-013-1000-5

Nunes, E. W. L. P., C. Esteras, A. O. Ricarte, E. Martínez-Perez, M. L. Gómez-Guillamón, G. H. S. Nunes, and M. B. Picó. 2017. Brazilian melon landraces resistant to *Podosphaera xanthii* are unique germplasm resources. Ann. Appl. Biol. 171:214–228. doi:10.1111/aab.12370

Pitrat, M., P. Hanelt, and K. Hammer. 2000. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. Acta Hortic. 510:29–36. doi:10.17660/ActaHortic.2000.510.4

Wang, X., G. Li, X. Gao, L. Xiong, W. Wang, and R. Han. 2011. Powdery mildew resistance gene (*Pm-AN*) located in a segregation distortion region of melon LGV. Euphytica 180:421–428. doi:10.1007/s10681-011-0406-1

Wang, Y. H., D. H. Wu, J. H. Huang, S. J. Tsao, K. K. Hwu, and H. F. Lo. 2016. Mapping quantitative trait loci for fruit traits and powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo*). Bot. Stud. 57:19. doi:10.1186/s40529-016-0130-1

Yuste-Lisbona, F. J., C. Capel, M. L. Gómez-Guillamón, J. Capel, A. I. López-Sesé, and R. Lozano. 2011. Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). Theor. Appl. Genet. 122:747–758. doi:10.1007/s00122-010-1483-6

Morphological Diversity and Resistance to Powdery Mildew in Melon (*Cucumis melo* L.) Accessions

Ssu-Yu Lin[1], Jin-Hsing Huang[2], and Yu-Hwa Wang[3,*]

Abstract

Lin, S. Y., J. H. Huang, and Y. H. Wang. 2020. Morphological diversity and resistance to powdery mildew in melon (*Cucumis melo* L.) accessions. J. Taiwan Agric. Res. 69(2):169–183.

As climate changes rapidly and the demands of diverse melon increase, melon market has urgent needs of commercial lines with stress-resistance, varied appearance and high-quality fruits. Because genetic diversity is the basis of melon breeding, comprehensive understanding of the melon germplasm and breeding line is essential. In this study, 102 melon accessions are collected and 32 horticultural traits are investigated in two seasons. According to the principle component analysis, two subspecies- *Cucumis melo* ssp. *melo* and ssp. *agrestis*, can be separated clearly, and major botanical groups can also be distinguished. Screening for resistance to powdery mildew pathogen (*Podosphaera xanthii* race 1) is also conducted in this study by leaf-disc inoculation. Results show that 30 accessions possess constant resistance and most of them belong to botanical group momordica, acidulus and reticulatus. With the horticultural traits and powdery mildew resistance of germplasm and breeding line, manpower and time required at initial stage of breeding can be significantly reduced.

Key words: Melon, Morphological diversity, Powdery mildew, Germplasm.

Received: June 18, 2019; Accepted: February 4, 2020.

* Corresponding author, e-mail: yhwang@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Director, Farm Management Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editor

Lin, Nai-Chun
Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University
Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute
Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 69 No. 2 June 30, 2020

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330